

UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE

AIX-MARSEILLE II

Faculté des Sciences de Luminy

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE II

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

Camille Allene

Le 3 décembre 2010

Titre :

Structure-fonction des patrons d'activité séquentiels des réseaux corticaux au cours du développement postnatal chez le rongeur.

Jury :

Dr. Lydia KERKERIAN-LE GOFF, président

Dr. Pascal LEGENDRE, rapporteur

Pr. Urs GERBER, rapporteur

Dr. Frédéric CHAVANE, examinateur

Pr. Enrico CHERUBINI, examinateur

Dr. Rosa COSSART, directeur de thèse

Résumé :

Une des caractéristiques remarquables des structures cérébrales en développement est leur propension à exprimer des patrons d'activité neuronale corrélée spontanés (Pour revue : Blankenship and Feller, 2010). Au cours de la première semaine de vie postnatale chez le rongeur, se succèdent des patrons aux caractéristiques spatio-temporelles différentes, portés par des mécanismes cellulaires différents. On identifie donc différents stades de développement d'activité neuronale corrélée constituant une séquence. Notre hypothèse est que cette séquence ne reflète pas uniquement la maturation séquentielle des propriétés intrinsèques et synaptiques des neurones individuels, mais qu'elle participe directement aux processus de maturation. Nous avons testé cette hypothèse au cours de cette thèse, à partir de l'étude de la séquence des patrons d'activité neuronale corrélée de l'hippocampe et du néocortex pendant la première semaine de vie postnatale chez le rongeur. Pour suivre en parallèle la maturation des réseaux et des neurones individuels qui le composent, nous avons suivi la dynamique des activités de réseau en imagerie calcium biphoton et réalisé en parallèle des enregistrements électrophysiologiques de neurones cibles.

Nous avons montré que les SPAs, premier patron d'activité neuronale corrélée à s'exprimer au sein de l'hippocampe en développement (Crepel et al., 2007), s'expriment également au sein du néocortex immature avec des caractéristiques spatio-temporelles et des mécanismes similaires à ceux rapportés dans l'hippocampe. Ceci suggère une implication générale des SPAs dans la maturation des réseaux. Nous avons montré en parallèle que les ENOs, oscillations calciques dominant l'activité du néocortex au cours des premiers jours suivant la naissance (Adelsberger et al., 2005; Garaschuk et al., 2000) sont exprimées en même temps que les SPAs. Les ENOs se caractérisent par leur sensibilité à la concentration extracellulaire de glutamate et leur renforcement en condition d'anoxie modérée, suggérant que cette forme d'activité pourrait en réalité être l'expression de conditions pathologiques. Nous avons enfin montré que la séquence de mise en place des patrons d'activité neuronale corrélée du néocortex se terminait avec l'apparition des GDPs, décrits pour la première fois ici au sein du néocortex et portés par la transmission GABAergique, dépolarisante à ce stade du développement (Ben Ari et al., 1989; Crepel et al., 2007; Garaschuk et al., 1998). Se basant sur les similarités apparentes de ces patrons d'activités, les ENOs du néocortex étaient considérées comme les homologues néocorticaux des GDPs de l'hippocampe. Nous avons montré ici que ENOs et GDPs sont deux patrons d'activité distincts, caractérisés par des mécanismes et des dynamiques spatio-temporelles différents.

Nous avons ensuite étudié le devenir et les propriétés morpho-physiologiques des cellules impliquées dans les SPAs en fonction de la maturation du réseau hippocampique. Dans ce but, nous avons mis au point un protocole d'imagerie calcium chronique sur tranches organotypiques d'hippocampe, afin de suivre la même population de neurones jour après jour. Nous avons montré que la majorité des cellules SPAs intégraient le réseau synaptique sous-tendant la genèse des GDPs en quelques jours. Parallèlement, nous avons montré que les interneurones GABAergiques impliqués dans les SPAs présentaient des caractéristiques morpho-physiologiques spécifiques telles qu'un patron de décharge de potentiels d'action immature, une fréquence élevée de courants miniatures postsynaptiques de grande amplitude et la présence de filopodes somatiques, qui les distinguent des interneurones impliqués dans les GDPs.

Ces résultats apportent des preuves directes de l'existence d'une corrélation entre la maturation du réseau et celle des neurones individuels qui le constituent et montrent en particulier comment de profonds changements développementaux concernant les propriétés morpho-physiologiques des interneurones GABAergiques annoncent l'émergence des GDPs.

Table des matières

Liste des abréviations.....	4
Liste des illustrations.....	5
Introduction générale.....	6
Chapitre I. La maturation des microcircuits glutamatergiques est à la fois fortement prédéterminée génétiquement et dépendante de l'activité.....	10
I.1. Une forte prédétermination génétique de leur genèse et migration	10
I.2. Une mise en place organisée et prédéterminée de leur connectivité.....	11
I.3. Une mise en place progressive des propriétés électrophysiologiques.....	12
I.4. Une maturation synaptique prolongée et complexe.....	13
Chapitre II. La maturation des interneurones gabaergiques joue un rôle crucial dans la mise en place des réseaux corticaux au cours du développement.....	16
II.1. Les interneurones, une population pionnière des réseaux en développement.....	16
II.2. Les interneurones, une population aisément recrutée dans les activités de réseau précoce.....	18
II.3. Une maturation postsynaptique précoce de certains groupes d'interneurones.....	18
II.4. Une caractéristique spécifique des interneurones immatures : leur dépolarisation par la transmission GABAergique.....	20
Chapitre III. Les patrons d'activité neuronale corrélée des structures du système nerveux en développement partagent des principes d'organisation et de maturation communs.....	22
III.1. Une organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale spontanés au cours du développement.....	24
III.1.1 Organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée de la rétine en développement.....	24
III.1.2 Organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée de l'hippocampe en développement.....	25
III.1.3 Organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée du néocortex en développement.....	28
III.1.4 Organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée de la moelle épinière en développement.....	31
III.2. Les activités électriques du développement sont spontanées et propagées.....	32
III.3. Les mécanismes sous-jacents aux activités du développement.....	33
III.3.1. Les jonctions gap aux stades précoce du développement.....	34
III.3.2 La transmission synaptique succède les jonctions gap.....	34
III.4. Une topologie de réseau similaire entre les différentes structures cérébrales.....	34
Chapitre IV. Les rôles des activités neuronales au cours du développement.....	36
IV.1. Le rôle de l'activité dans la prolifération neuronale.....	37
IV.2. Le rôle de l'activité dans la migration neuronale.....	37
IV.3. Le rôle de l'activité dans le guidage axonal.....	39
IV.4. Le rôle de l'activité dans la croissance neuritique.....	40
IV.5. Le rôle de l'activité dans la spécification des neurotransmetteurs et de leurs récepteurs.....	41
IV.6. Le rôle de l'activité dans la maturation synaptique.....	42
IV.7. Le rôle de l'activité dans l'expression des canaux ioniques voltage-dépendants.....	43
IV.8. Le rôle de l'activité dans le développement de centres générateurs de rythme.....	44
IV.9. Le rôle de l'activité dans l'affinement des cartes sensorielles.....	44

IV.10 Le rôle de l'activité dans l'apoptose ou la survie neuronale.....	47
Résultats.....	48
Article I	49
Article II	51
Discussion générale.....	86
I. Les ENOs, sont-elles un patron d'activité neuronale physiologique ou pathologique?.....	88
1.1 . Les ENOs, oscillations transmises par les récepteurs NMDA : un rôle dans la maturation des synapses ?.....	88
1.2. Les ENOs : un « état critique » du réseau en développement ?.....	89
2. Fonctions possibles du premier patron d'activité neuronale corrélée du cortex en développement, le SPA.....	92
2.1 Un rôle dans la maturation synaptique ?.....	92
2.2. Le SPA : un mécanisme de compensation en cas de déficit de l'excitabilité neuronale, nécessaire au cours du développement ?.....	94
2.3 Un rôle dans la mort neuronale programmée du développement ?.....	95
2.4. Un rôle dans la fin de la migration neuronale ?.....	96
Perspectives.....	99
Annexes.....	101
Article <i>in press</i>	102
Article de revue.....	103
Références Bibliographiques.....	104

Liste des abréviations :

ACSF: Artificial Cerebro-Spinal Fluid
AHP: After HyperPolarisation
AMPA: α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate
AP: Action Potential
bHLH: basic helix-loop-helix
CCK: Cholecystokinin
CGE: Caudal ganglionic eminences
Cm: membrane capacitance
CPG: Central Generator Pattern
DL-BHB: DL-3-hydroxybutyrate
DL-TBOA: DL-Threo- β -Benzylxyaspartate
EAAT: Excitatory Amino Acid Transporter
ENOs: Early Network Oscillations
GABA: γ -Aminobutyric acid
GDPs: Giant Depolarizing Potentials
IP3: inositol trisphosphate
KCC2: K+/Cl- co-transporter isoform 2
Kir2.1: inward-rectifier potassium ion channel (encoded by the KCNJ2 gene)
mEPSCs: miniature Excitatory PostSynaptic Currents
MGE: Medial ganglionic eminences
mGluRs: Metabotropic Glutamate Receptors
mIPSCs: miniature Inhibitory PostSynaptic Currents
NKCC1: Na+/K+/Cl- co-transporter isoform 1
NPY: neuropeptide Y
nACh: nicotinic acetylcholine
NaChBac: bacterial sodium channels
NMDA: N-Methyl-D-aspartic acid
NO: Nitric oxide
Rm: membrane resistance
SD: standard deviation
sEPSCs: spontaneous Excitatory PostSynaptic Currents
sIPSCs: spontaneous Inhibitory PostSynaptic Currents
SNOs: Slow Network Oscillations
SPAs: Synchronous Plateau Assemblies
TTX: Tetrodotoxin
Vrest: resting membrane potential

Liste des illustrations

Figures de l'introduction :

Figure 1: représentation schématique de la mise en place du réseau hippocampique et néocortical au cours du développement.....	9
Figure 2: Mise en place de la diversité fonctionnelle de la population des neurones GABAergiques au cours du développement	17
Figure 3: Mise en place séquentielle des synapses GABAergiques et glutamatergiques au sein des interneurones et des cellules pyramidales au cours du développement chez le rat.....	19
Figure 4: Le SPA : assemblées de neurones produisant des plateaux calciques synchronisés par jonctions gap	26
Figure 5: GDPs détectés en imagerie calcium bi-photon.....	27
Figure 6: ENOs : oscillations calciques à grande échelle exprimées dans le néocortex de rongeur au cours des premiers jours postnataux	30
Figure 7: Profil temporel des principaux grands processus développementaux du cortex cérébral chez le rat.....	36
Table 1: Résumé des patrons d'activité neuronale corrélée de différentes structures cérébrales au cours du développement chez le rongeur.....	23

Figures des résultats II:

Figure 1: Les cellules SPA intègrent le réseau synaptique sous-tendant la genèse des GDPs.....	66
Figure 2: Une faible proportion de cellules SPA déclenche un programme apoptotique.....	67
Figure 3: Les interneurones GABAergiques sont largement impliqués dans l'activité SPA.....	68
Figure 4: Propriétés morpho-physiologiques des neurones GABAergiques impliqués dans les SPAs.....	69
Figure 5: Comparaison des courants postsynaptiques miniatures reçus par les interneurones impliqués dans les SPAs et impliqués dans les GDPs.....	70
Table 1: Propriétés électrophysiologiques des interneurones SPA et GDP.....	71
Table 2: Propriétés des courants postsynaptiques des interneurones SPA et GDP.....	72
Table 3: quantification des dendrites et des protrusions somatiques des interneurones SPA et GDP.....	73

Figures de la discussion :

Figure 1: Séquence générale de mise en place des patrons d'activité neuronale corrélée du néocortex en développement	87
Figure 2: Les ENOs présentent de fortes similarités avec des activités neuronales corrélées physiologiques et pathologiques.....	91
Figure 3: Spéculation sur le rôle possible de l'activité SPA dans la maturation des microcircuits corticaux	98

Introduction générale

Le cerveau possède plus de 100 milliards de neurones interconnectés qui permettent de produire nos comportements et nos processus cognitifs. Une stratégie des Neurosciences pour comprendre comment le cerveau accomplit cette fonction complexe, est l'étude des microcircuits neuronaux. Les microcircuits sont considérés comme les unités élémentaires de traitement de l'information et sont généralement appelés « modules fonctionnels » (Cutsuridis et al., 2009;Grillner, 2006;Silberberg et al., 2005). En effet, un microcircuit est défini par le nombre minimal de neurones connectés qui produisent collectivement une réponse spécifique et fonctionnelle (Silberberg et al., 2005). Par exemple, le centre générateur de rythme (CPG pour Central Generator Pattern) de la moelle épinière est considéré comme un microcircuit fonctionnel avec moins de 0.1 % des neurones des segments lombaires supérieurs (Cina and Hochman, 2000) qui permettent le contrôle de la locomotion (Hultborn and Nielsen, 2007). Au niveau des cortex sensoriels tels que le cortex somatosensoriel et le cortex visuel, la colonne corticale est aussi considérée comme un microcircuit fonctionnel : anatomiquement, une colonne corticale délimite un groupe de neurones connectés qui s'étendent verticalement à travers les couches du cortex (Mountcastle, 1997) ; fonctionnellement, la colonne corticale est à l'origine des représentations internes ou « cartes » topographiques du monde extérieur (Hubel and Wiesel, 1962;Mountcastle, 1957;Schubert, 2007).

Les microcircuits fonctionnels varient d'une structure cérébrale à l'autre mais également au sein d'une même structure (Buxhoeveden and Casanova, 2002;Catania and Remple, 2002;Mountcastle, 1997;Purves and LaMantia, 1990;Rockland and Ichinohe, 2004;Shipp and Zeki, 2002) en fonction de l'échelle à laquelle ils sont étudiés, suggérant une organisation hiérarchique des modules fonctionnels (Binzegger et al., 2004;Kaiser et al., 2009;Meunier et al., 2009;Mountcastle, 1997). Par exemple, une colonne corticale peut être subdivisée en plusieurs colonnes de neurones très étroites appelées mini-colonnes (Mountcastle, 1978). Des microcircuits à échelle encore plus fine ont été décrits par plusieurs études qui montrent qu'un neurone unique et spécifique est capable de produire une réponse fonctionnelle (Bonifazi et al., 2009;Brecht et al., 2004;Ellender et al., 2010;Houweling and Brecht, 2008;Li et al., 2009;London et al., 2010;Miles and Wong, 1983;Molnar et al., 2008). Par exemple, notre équipe a récemment montré qu'au sein de l'hippocampe en

développement, un seul neurone spécifique (un neurone GABAergique « hub ») pouvait orchestrer l'activité synchrone du réseau (Bonifazi et al., 2009).

Nous pensons que la Neurobiologie du Développement offre des outils conceptuels et expérimentaux pour comprendre l'organisation fonctionnelle des microcircuits neuronaux: observer un système en développement aide à comprendre comment il s'organise pour fonctionner correctement. Par définition, le développement du cerveau est associé à la mise en place des connexions neuronales et se caractérise par la genèse de patrons stéréotypés d'activité neuronale coordonnée (Ben-Ari et al., 2007;Khazipov and Luhmann, 2006;Moody and Bosma, 2005;O'Donovan, 1999;Roerig and Feller, 2000). Plusieurs études montrent que tout au long de la période développementale, le système nerveux exprime des activités neuronales «corrélées», c'est à dire des périodes de co-activation de plusieurs neurones enregistrées en électrophysiologie ou imagerie. Ces co-activations impliquent un plus grand nombre de neurones que celui pouvant survenir par chance, autrement dit, cette co-activation est statistiquement significative. Notons que ces activités corrélées peuvent en réalité correspondre à des activations plus ou moins synchrones dans le temps selon la résolution temporelle de la technique utilisée pour mesurer l'activation neuronale. Ces activités neuronales corrélées possèdent des dynamiques variables et sont contrôlées par différents mécanismes selon la structure neuronale mais également au sein d'une même structure en fonction de la période du développement (Crepel et al., 2007;Khazipov and Luhmann, 2006;McCabe et al., 2006;Sibilla et al., 2009;Syed et al., 2004). En particulier une séquence de patron d'activité neuronale corrélée dans l'hippocampe en développement a été décrite par l'équipe juste avant ce travail de thèse. Dans cette structure, le premier patron d'activité neuronale coordonnée émerge à la naissance et synchronise par jonctions Gap des assemblées de neurones produisant des plateaux calciques observés en mesurant les variations de fluorescence d'un indicateur calcium; ce patron d'activité neuronale est alors baptisé SPA pour « Synchronous Plateau Assemblies » (Crepel et al., 2007). Le patron d'activité neuronale qui succède aux SPAs sont les GDPs pour «Giant Depolarizing Potentials» qui synchronisent un grand nombre de neurones par transmission synaptique. Concernant le néocortex, il s'agit probablement de la structure pour laquelle la plus grande variété de patrons d'activité neuronale corrélée du développement a été décrite (Adelsberger et al., 2005;Corlew et al., 2004;Dupont et al., 2006;Garaschuk et al., 2000;Kandler and Katz, 1998;Khazipov et al., 2004;McCabe et al., 2006;Milh et al.,

2007b;Opitz et al., 2002;Owens and Kriegstein, 1998;Peinado, 2000;Voigt et al., 2001;Weissman et al., 2004;Yuste et al., 1992;Rheims et al., 2008a).

Le rôle de ces activités neuronales corrélées et spontanées du développement dans la maturation des microcircuits corticaux est la question principale de ce travail de thèse. La technique que nous avons utilisée pour étudier le microcircuit, avec une résolution permettant de distinguer chaque cellule qui le constitue, est la microscopie calcium bi-photonique couplée aux enregistrements électrophysiologiques. L'originalité de l'approche ici est donc d'avoir accès simultanément aux deux niveaux d'observation : le réseau et la cellule.

De nombreuses études montrent que l'activité au cours du développement joue un rôle dans la maturation des neurones corticaux (Cancedda et al., 2007;Lin et al., 2008a;Moody and Bosma, 2005;Wang and Kriegstein, 2008) et suggèrent qu'un patron d'activité neuronale corrélée donné pourrait directement être la cause des changements des propriétés neuronales et de l'organisation du réseau qui permettraient en retour de terminer ce patron et de démarrer le suivant (Lischalk et al., 2009;Moody and Bosma, 2005) Connaitre la maturation des neurones qui composent le microcircuit est donc primordiale pour étudier la maturation du microcircuit lui-même. Les structures corticales étudiées ici étant l'hippocampe et la plaque corticale du néocortex somatosensoriel (figure I), tous deux composés de cellules pyramidales glutamatergiques et d'interneurones GABAergiques, nous présenterons dans cette introduction l'état actuel des connaissances sur la maturation des cellules pyramidales et sur la maturation des interneurones, respectivement dans une première et deuxième partie. Par ailleurs, on a vu précédemment que le développement du cerveau se caractérise par la genèse de patrons d'activité neuronale corrélée stéréotypés. Notons que cette caractéristique concerne aussi les structures du système nerveux périphérique telle la cochlée (Tritsch et al., 2007). Une telle universalité indique que les structures neuronales partagent probablement des principes d'organisation et de maturation communs. Il est donc important de connaitre les mécanismes et le rôle possible des patrons d'activité neuronale corrélée du développement de chaque structure ; la troisième partie de l'introduction présentera donc l'état actuel des connaissances sur les séquences de patrons d'activité neuronale et sur leurs mécanismes au sein de chaque structure cérébrale en développement étudiée précédemment et la quatrième partie exposera les rôles possibles de l'activité neuronale du développement.

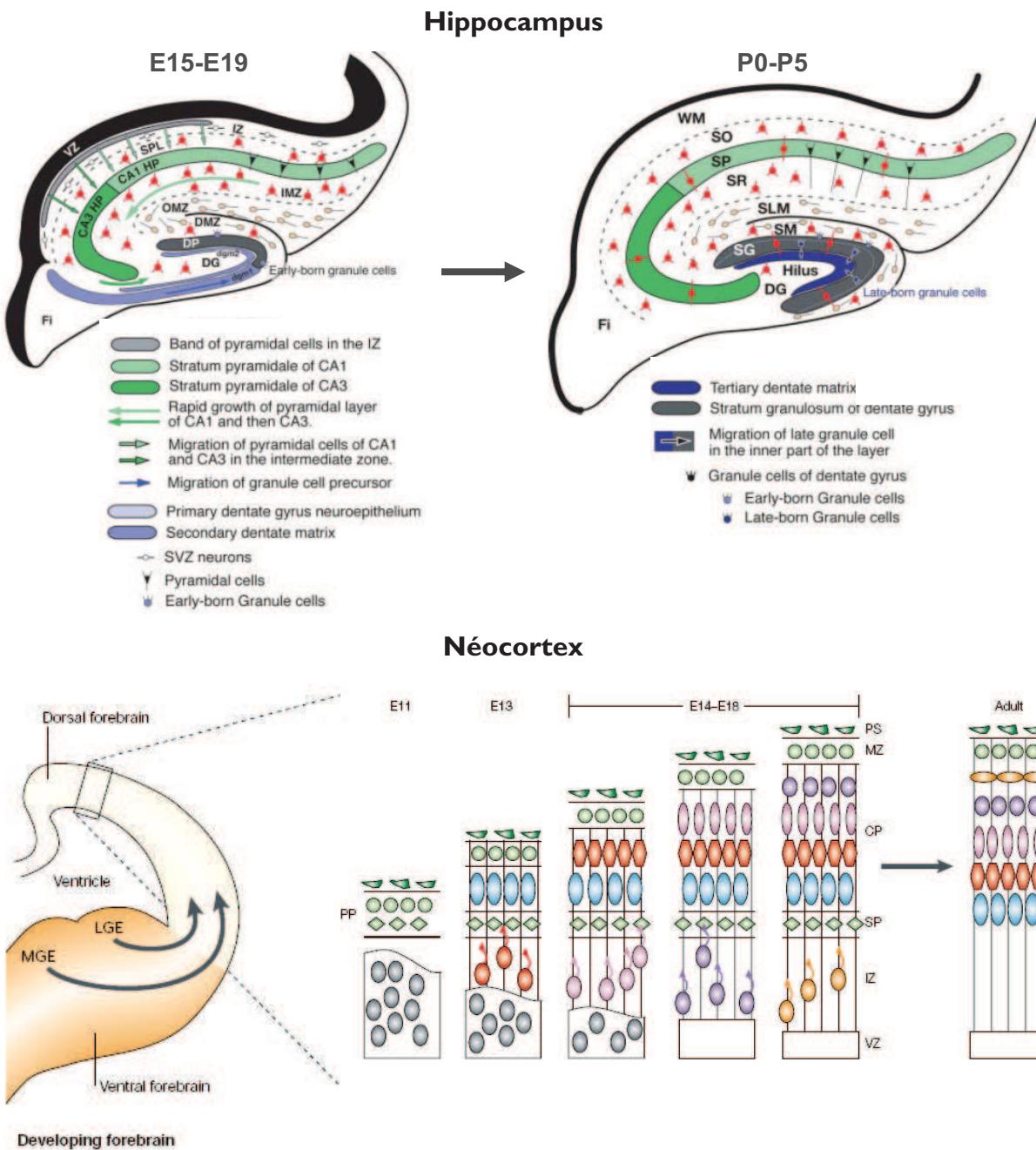


Figure 1 : représentation schématique de la mise en place du réseau hippocampique et néocortical au cours du développement.

Le schéma de la mise en place du circuit tri-synaptique spécifique de l'hippocampe est extrait de Danglot et al., 2006.

Le schéma de la mise en place des couches corticales est extrait de Nadarajah and Parnavelas, 2002 et de Gupta et al., 2002.

Le cerveau antérieur donne naissance au cortex cérébral. Les éminences ganglionnaires latérales (LGE) et médiales (MGE) du cerveau antérieur ventral génèrent les interneurones corticaux qui suivent des voies de migration tangentielles vers le cortex (représentées par des flèches). Les étapes clés du développement des composants radiaux de la formation laminaire du néocortex sont représentées, les neurones se mettent en place par une migration d'abord vers les couches profondes puis vers les couches superficielles (inside-out) principalement le long des fibres radiales des cellules gliales (représentées par des barres verticales).

VZ : zone ventriculaire ; PP : Pré-plaque ; SP : sous plaque ; CP : plaque corticale ; MZ : zone marginale ; PS : Pial Surface.

Chapitre I. La maturation des microcircuits glutamatergiques est à la fois fortement prédéterminée génétiquement et dépendante de l'activité

Les cellules pyramidales glutamatergiques représentent 70 à 80 % des neurones corticaux. Elles possèdent des propriétés anatomiques, physiologiques et moléculaires relativement stéréotypées (DeFelipe and Farinas, 1992; Peters and Jones, 1984; Peters and Sethares, 1991) surtout en comparaison des interneurones GABAergiques (présentés dans la partie II de l'introduction), qui représentent les 20 à 30 % des neurones corticaux restants et possèdent une grande diversité concernant leur morphologie, leur patron d'activité électrophysiologique et leur contenu moléculaire (Ascoli et al., 2008; Freund and Buzsáki, 1996; Markram et al., 2004). Cependant, certaines études suggèrent que cette population à priori homogène comporte également des sous- types fonctionnels différents. En effet, il existe différentes morphologies dendritiques et différents patrons de décharge des cellules pyramidales qui sont corrélés avec leurs cibles de projections axonales et donc avec leur sortie fonctionnelle (Chagnac-Amitai and Connors, 1989; Gao and Zheng, 2004; Hattox and Nelson, 2007; Hefti and Smith, 2000; Mason and Larkman, 1990; Morishima and Kawaguchi, 2006; Otsuka and Kawaguchi, 2008; Tsiola et al., 2003; Wittner and Miles, 2007).

I.I. Une forte prédétermination génétique de leur genèse et migration

Les cellules pyramidales sont générées entre le seizième jour embryonnaire (E16) et E19 chez le rat (Danglot et al., 2006) et entre E14 et E16 chez la souris (Soriano et al., 1986; Soriano et al., 1989b; Soriano et al., 1989a). Les cellules pyramidales glutamatergiques sont produites par une série de programmes génétiques contrôlés par des facteurs de transcription spécifiques tels que les protéines à motif hélice-boucle-hélice basique (bHLH pour basic helix-loop-helix), qui sont les principales molécules parmi les facteurs de transcription de la neurogenèse et de la prolifération (Ross et al., 2003). Cette grande superfamille possède des membres qui maintiennent l'activité proliférative et suppriment la différentiation (les familles Id et Hes, par exemple) ainsi que des facteurs de transcription « proneural » qui favorisent le devenir neuronal, suppriment la différentiation gliale (Sun et al., 2001) et induisent la sortie du cycle mitotique (par exemple : Ngn1 et Ngn2). D'autres types de facteurs de transcription, non-bHLH, régulent la prolifération et la neurogenèse. Par exemple, Emx2 et Tlx favorisent la prolifération des progéniteurs (Heins et al., 2001; Roy et al., 2004) alors que Pax6 favorise la neurogenèse (Heins et al., 2002; Scardigli et al., 2003). Lef1/TCF, un facteur de transcription activé par la voie de signalisation Wnt, favorise la

prolifération au stade précoce de la corticogenèse et favorise la différentiation neuronale à la fin de la corticogenèse (Chenn and Walsh, 2002; Hirabayashi et al., 2004). Il semble que les mêmes facteurs de transcription soient exprimés, dans le même ordre, lors de la neurogenèse glutamatergique des neurones, à la fois au sein du cortex cérébral et de l'hippocampe, en développement et aux stades adultes, ainsi que dans le cervelet en développement, suggérant que ce sont des programmes génétiques conservés au cours de l'évolution qui vont, en partie, spécifier les propriétés générales des neurones glutamatergiques (Hevner, 2006). Les cellules pyramidales sont directement issues des cellules radiales au sein du neuroépithélium de la zone ventriculaire (Malatesta et al., 2000; Miyata et al., 2001; Miyata et al., 2010; Noctor et al., 2004; Tamamaki et al., 2001). Les divisions cellulaires asymétriques successives d'une cellule radiale individuelle produit plusieurs clones de cellules pyramidales (Kornack and Rakic, 1995; Noctor et al., 2001; Noctor et al., 2004) qui vont migrer de façon radiale, dans le sens des couches les plus profondes vers les couches superficielles (pour revue : Parnavelas, 2000) grâce aux fibres radiales. Notons que les hémicanaux des jonctions gap contribuent mécaniquement à cette migration radiale des cellules pyramidales (Cina et al., 2009; Elias et al., 2007; Elias and Kriegstein, 2008; Fushiki et al., 2003; Nadarajah et al., 1997).

Ainsi ce sont majoritairement les cellules pyramidales issues d'une même cellule radiale qui vont former un microcircuit fonctionnel en colonne (Noctor et al., 2001; Tamamaki et al., 2001).

I.2. Une mise en place organisée et prédéterminée de leur connectivité

Une étude a montré que la connectivité des cellules pyramidales au sein des colonnes corticales du cortex à tonneaux (« barrel cortex » en anglais) se met en place de manière organisée et monotone (Bureau et al., 2004), c'est-à-dire avec une grande précision (Bureau et al., 2004; Callaway and Lieber, 1996; Katz, 1991), sans passer par un stade d'hyper-innervation qui serait suivi d'un affinement des connections via l'« élagage » (ou « pruning » en anglais) de l'arborisation axonale, comme le prévoyait le modèle dominant de la construction des circuits corticaux (Katz and Shatz, 1996). Un autre groupe a récemment montré que les cellules pyramidales issues de la même cellule gliale radiale ont tendance à développer des connexions synaptiques entre elles plutôt qu'avec leurs voisines issues d'une autre cellule gliale radiale (Yu et al., 2009). De plus, les connexions synaptiques entre deux cellules pyramidales sœurs sont unidirectionnelles et présentent la même préférence

directionnelle interlaminaire que celle observée chez l'adulte (Yu et al., 2009). Ces études montrent une mise en place précise des microcircuits fonctionnels entre les cellules pyramidales du néocortex au cours du développement. Pour ce qui est de l'hippocampe, la seconde structure qui nous intéresse, il existe moins de données concernant la mise en place de ces microcircuits, cependant il est fortement probable que cette structure suive des règles de développement comparables au néocortex, puisqu'il s'agit également d'une structure corticale dont les cellules principales glutamatergiques sont organisées en couches. Enfin, il a été établi dans l'hippocampe une forte corrélation entre le développement morphologique de l'arborisation dendritique des cellules pyramidales et la mise en place de leurs synapses GABAergiques et glutamatergiques (Tyzio et al., 1999).

I.3. Une mise en place progressive des propriétés électrophysiologiques

Concernant la maturation de leurs propriétés électrophysiologiques, plusieurs études ayant examiné les cellules pyramidales de la couches V du néocortex (Kasper et al., 1994; McCormick and Prince, 1987; Rheims et al., 2008a; Zhang, 2004) et celles de la région CA1 de l'hippocampe (Spigelman et al., 1992), ont montré qu'au cours des premiers jours suivant la naissance les cellules pyramidales se caractérisent par un potentiel de repos plus dépolarisé (~ -65 mV à P3 versus ~ -80 mV à P21), leur résistance d'entrée est élevée (>1000 M Ω à P3 versus <100 M Ω à P21), leur constante de temps membranaire est longue (~ 70 ms à P3 versus ~ 13 ms à P21), l'amplitude et la durée de leurs potentiels d'action est respectivement basse (~ 52 mV à P3 versus ~ 80 mV à P21) et longue (~ 4 ms à P3 versus ~ 1 ms à P21) (Kasper et al., 1994; McCormick and Prince, 1987; Rheims et al., 2008a; Zhang, 2004). Etant donné leur résistance d'entrée élevée, les cellules pyramidales de la première semaine postnatale nécessitent des courants de plus petite amplitude pour atteindre leurs fréquences de décharge de potentiels d'action maximales (des créneaux de +20 pA induisent des trains de potentiel d'action à P3 versus +100 pA à P21) mais leurs fréquences de décharges maximales sont plus basses (~ 30 Hz à P3 versus ~ 60 à P21) (Zhang, 2004). La relation courant / voltage est plus linéaire qu'aux stades matures (Zhang, 2004; Kasper et al., 1994; Spigelman et al., 1992 ; McCormick and Prince, 1987). Enfin, les protocoles qui induisent une dépression à court terme à P7 changent progressivement pour induire une facilitation aux âges plus avancés (Zhang, 2004). L'ensemble de ces résultats suggère une modification considérable de la densité des canaux ioniques voltage-dépendants,

qui sous-tendent les réponses électrophysiologiques des cellules pyramidales, au cours du développement postnatal.

I.4. Une maturation synaptique prolongée et complexe

A l'échelle de la synapse, la formation des synapses glutamatergiques pleinement fonctionnelles semble être un processus prolongé avec un stade initial de formation synaptique, suivi de plusieurs stades de maturation (Atwood and Wojtowicz, 1999; Ziv and Garner, 2001). Au niveau présynaptique, les événements majeurs de la maturation synaptique sont la formation des pools de vésicules synaptiques (Blue and Parnavelas, 1983; Mohrmann et al., 2003) ainsi que les changements des composants moléculaires, tels qu'un changement du niveau d'expression des variants d'épissage des isoformes de la protéine SNAP-25, membres de la famille des protéines réceptrices SNARE, qui permettent de réguler la fusion des vésicules avec la membrane plasmique présynaptique et donc de réguler la libération des neurotransmetteurs (Bark et al., 2004). Les synapses glutamatergiques au sein de l'hippocampe en développement présentent une forte probabilité de libération qui est réduite au cours de leur maturation fonctionnelle (Bolshakov and Siegelbaum, 1995; Chavis and Westbrook, 2001; Wasling et al., 2004). Une étude a montré que la forte probabilité de libération du glutamate au niveau présynaptique est corrélée à la présence de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA au niveau postsynaptique (Chavis and Westbrook, 2001). La maturation présynaptique des cellules pyramidales du néocortex a été très peu étudiée. Toutefois, Walz et ses collaborateurs ont montré récemment qu'une part significative des entrées synaptiques glutamatergiques des cellules pyramidales du cortex somatosensoriel à P7, présentait une faible probabilité de libération, positivement corrélé au niveau d'expression des récepteurs NMDA ayant la sous-unité NR2B, au niveau post-synaptique (Walz et al., 2010). Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2A sont trouvés uniquement au niveau de synapses plus matures, ayant une plus grande probabilité de libération (Walz et al., 2010). Notons que les résultats de cette étude, concernant la probabilité de libération des synapses glutamatergiques immatures du cortex somatosensoriel et sa corrélation avec la sous-unité NR2B, sont contraires à ceux obtenus au niveau de l'hippocampe, mentionnés plus haut.

Au niveau postsynaptique, les déterminants majeurs des stades de maturation synaptique sont l'incorporation membranaire des récepteurs au glutamate de type AMPA (Daw et al., 2007; Isaac, 2003) et les changements dans la composition des sous-unités du récepteur

NMDA (Flint et al., 1997;Monyer et al., 1994;Sheng et al., 1994). Au cours du développement postnatal de l'hippocampe, des synapses glutamatergiques fonctionnellement immatures ont été décrites au sein des cellules pyramidales. Les caractéristiques de ces synapses immatures, généralement qualifiées de « synapses silencieuses », sont l'absence totale de récepteurs AMPA et la présence de récepteurs NMDA (Durand et al., 1996;Isaac et al., 1997;Isaac, 2003;Leinekugel et al., 1997), dont l'activation dépend de la levée du blocage magnésium voltage-dépendant. Au sein du néocortex en développement, les synapses immatures ne contenant que des récepteurs NMDA ont été décrites au niveau de connections synaptiques spécifiques telles que les synapses thalamo-corticales du cortex à tonneaux (Isaac et al., 1997), les afférences glutamatergiques reçues par les cellules Cajal-Retzius de la couche I (Radnikow et al., 2002) ; et les synapses glutamatergiques du cortex visuel (Rumpel et al., 1998).

Concernant les modifications développementales dans la composition de leur sous-unités, les récepteurs NMDA postsynaptiques contiennent initialement les sous-unités NR2B (Herkert et al., 1998;Kubota and Kitajima, 2008;Monyer et al., 1994;Sheng et al., 1994;Tovar and Westbrook, 1999) et NR3A (Roberts et al., 2009;Wong et al., 2002) et ne possèdent pas de sous-unités NR2A. Les sous-unités NR2A apparaissent progressivement au cours du développement (Barria and Malinow, 2002;Carmignoto and Vicini, 1992;Chavis and Westbrook, 2001;Lindlbauer et al., 1998;Monyer et al., 1994).

Nous verrons plus loin, dans la partie IV de l'introduction, la fonction probable et controversée, du récepteur NMDA au cours du développement, en particulier dans la régulation du recrutement synaptique des récepteurs AMPA (Brill and Huguenard, 2008;Colonnese et al., 2003;Feldmeyer and Cull-Candy, 1996;Okabe et al., 1998;Radnikow et al., 2002;Shi et al., 2001;Voigt et al., 2005;Wang and Kriegstein, 2008;Zhu et al., 2000;Zhu and Malinow, 2002). Par ailleurs, l'activation des récepteurs NMDA semble être impliquée dans plusieurs patrons d'activité neuronale corticale du développement, surtout dans les patrons induits de manière pharmacologique tels que les co-activations neuronales massives induites dans le néocortex par l'application d'un bloqueur des transporteurs au glutamate et appelées « SNOs » pour Slow Network Oscillations (Demarque et al., 2004 ; Cattani et al., 2007) ou les activités oscillatoires synchrones de fréquence beta (~17 Hz), induites par un agoniste des récepteurs acétycholinergiques de type muscarinique (Demarque et al., 2004;Dupont et al., 2006). Ces récepteurs NMDA sont aussi impliqués au cours de phénomènes de plasticité des circuits corticaux en développement (Crair and Malenka,

1995;Daw et al., 2007;Feldman and Knudsen, 1998) et au sein du patron d'activité neuronale électrique de type « spindle-burst » qui domine le néocortex *in vivo* chez le rat nouveau né (Minlebaev et al., 2007). Enfin, les récepteurs NMDA semblent pouvoir être activés par la diffusion latérale (ou « spillover » en anglais) du glutamate (voir le résultat I), grâce à la combinaisons de caractéristiques particulières de ces récepteurs au cours du développement telles qu'une composition spécifique de leurs sous-unités (Kumar and Huguenard, 2003;Monyer et al., 1994), leur faible sensibilité au blocage magnésium près du potentiel de repos, leur grande affinité au glutamate (Binshtok et al., 2006;Cattani et al., 2007;Fleidervish et al., 1998) et leur présence au niveau des sites extrasynaptiques (Petralia et al., 2010).

Ainsi, bien que le développement des cellules pyramidales semble être relativement bien décrit et fortement déterminé par des facteurs génétiques et épigénétiques, la construction et la maturation des synapses glutamatergiques, reste moins évidente, probablement en raison de la variété structurelle et fonctionnelle des récepteurs NMDA.

Chapitre II. La maturation des interneurones gabaergiques joue un rôle crucial dans la mise en place des réseaux corticaux au cours du développement.

Comme nous l'avons mentionné plusieurs fois précédemment, une des caractéristiques remarquable de la population des interneurones est leur grande diversité (figure 2) qui concerne leur morphologie, leur activité électrophysiologique et leur contenu moléculaire (Ascoli et al., 2008) et dont la combinaison, quand elle peut être systématisée, les sépare en sous-types (pour revue Freund and Buzsáki, 1996;Markram et al., 2004). C'est cette diversité qui permet probablement aux interneurones de remplir la fonction complexe qui consiste à organiser dans le temps et l'espace la genèse de la plupart des oscillations de réseau associées aux grandes fonctions corticales (Cardin et al., 2009;Klausberger and Somogyi, 2008;Olah et al., 2009). Cette fonction centrale dans le réseau est accentuée lors du développement cortical pour plusieurs raisons que nous allons évoquer à travers les paragraphes ci-après.

II.I. Les interneurones, une population pionnière des réseaux en développement

Les interneurones sont les premiers à peupler les structures corticales en développement puisque le pic de genèse des interneurones gabaergiques a lieu environ deux jours avant celui de la population des cellules glutamatergiques chez le rongeur (Danglot et al., 2006). Les neurones gabaergiques corticaux, chez les vertébrés non primates, sont générés au niveau du *subpallium*, principalement à partir de deux structures transitoires : les éminences ganglionnaires médiales et caudales (MGE et CGE) (Anderson et al., 1997;Batista-Brito and Fishell, 2009;Marin and Rubenstein, 2001) mais aussi à partir de l'aire préoptique (Gelman et al., 2009). Parmi eux, quelques neurones gabaergiques deviennent postmitotiques et commencent leur migration tangentielle vers le cortex dès le dixième jour embryonnaire (E10) (Danglot et al., 2006;Miyoshi et al., 2007). Notons que l'origine embryonnaire en temps (entre E9.5 et E18.5) et en lieu (MGE versus CGE) des interneurones prédétermine fortement leur devenir morpho-physiologique adulte (Batista-Brito and Fishell, 2009;Butt et al., 2005;Miyoshi et al., 2007;Miyoshi et al., 2010;Wonders and Anderson, 2006;Xu et al., 2004). Le réseau GABAergique est opérationnel *in utero* au sein de la région CA1 de l'hippocampe alors que les cellules glutamatergiques sont faiblement développées et reçoivent très peu d'entrées synaptiques (Gozlan and Ben Ari, 2003;Hennou et al., 2002).

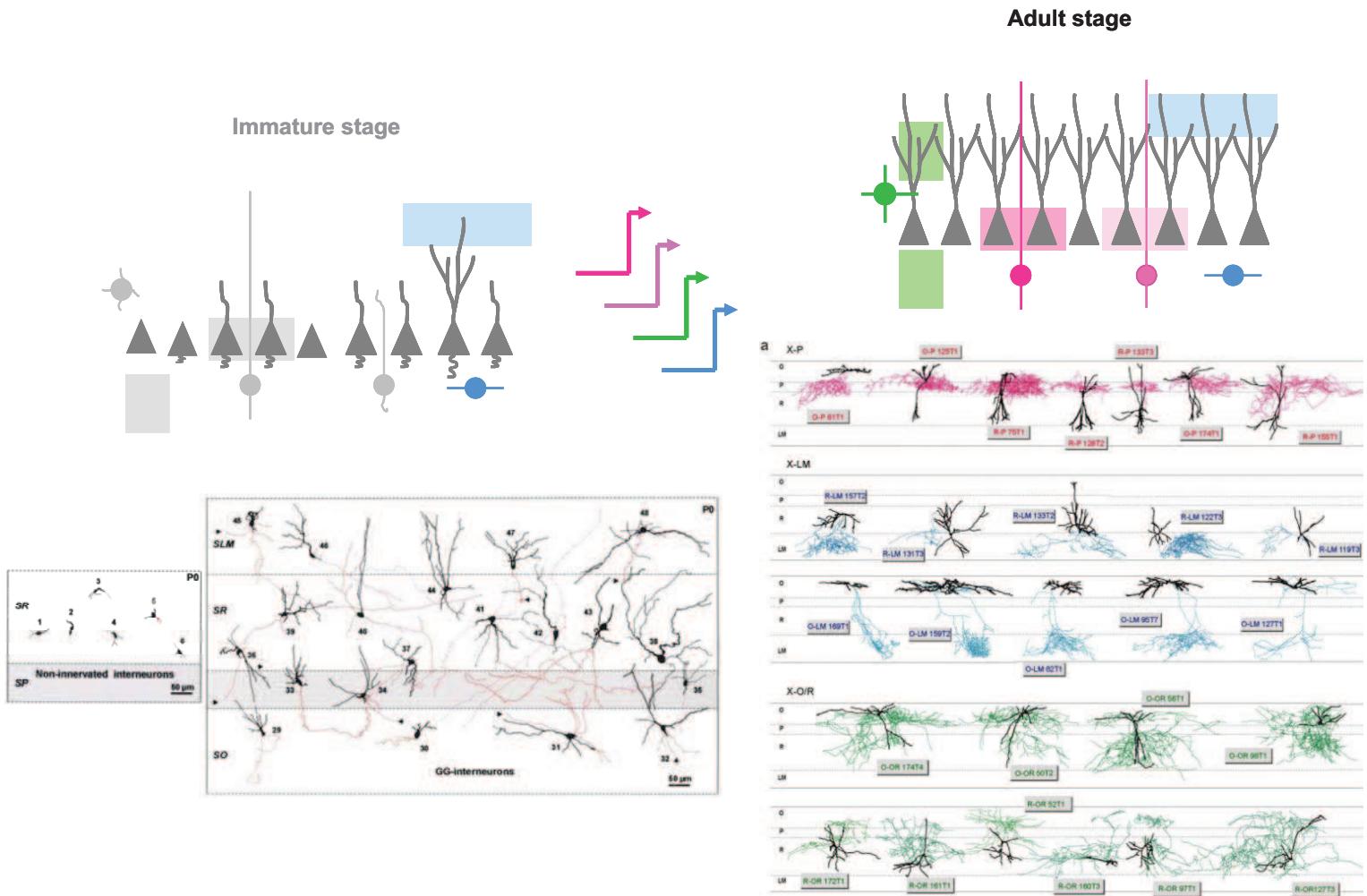


Figure 2 : Mise en place de la diversité fonctionnelle de la population des neurones GABAergiques au cours du développement.

Comparaison schématique entre un stade immature (autour de la naissance) du réseau hippocampique des interneurones en développement (gauche) et le stade adulte (droite). Au stade précoce du développement, le réseau d'interneurones contient (i) des interneurones bien développés possédant presque toutes leurs caractéristiques neurochimiques et morphologiques adultes (bleu) ; (ii) des interneurones avec des caractéristiques anatomiques développées mais qui n'expriment pas leurs propriétés neurochimiques caractéristiques (cellule grise future rose) (iii) les interneurones immatures à la fois dans l'aspect neurochimique et morphologique. Les interneurones qui appartiennent à la même famille (comme les cellules roses) peuvent se développer différemment. Les interneurones bien développés reçoivent déjà des entrées à la fois GABAergiques et glutamatergiques (interneurones GG) alors que les cellules pauvrement développées ne sont toujours pas innervées, comme illustré dessous. Notons qu'aucun des interneurones reconstruits à P0 ne présente une morphologie reconnaissable et similaire aux interneurones du stade adulte de l'hippocampe (panneau de droite) où les différents sous-types d'interneurones peuvent être aisément identifiés et classifiés selon leur arborisation. Extrait de Cossart et al., 2006.

II.2. Les interneurones, une population aisément recrutée dans les activités de réseau précoce

Les propriétés électrophysiologiques des interneurones immatures présentent, à l'image des cellules pyramidales (voir Partie I.3. de l'introduction), une durée plus longue de leur potentiel d'action, une plus grande résistance d'entrée et une constante de temps membranaire plus longue qu'aux stades plus matures (Doischer et al., 2008; Okaty et al., 2009). Cependant, les interneurones des couches V et II/III du néocortex, présentent un seuil de déclenchement des potentiels d'action plus bas que celui des cellules pyramidales aux stades postnataux (Rheims et al., 2008a), ce qui leur confère une plus grande excitabilité et une plus grande probabilité d'être recrutés aux phases précoce de la synchronisation neuronale (Rheims et al., 2008a). Enfin, l'émission de potentiels d'action par les interneurones de l'hippocampe immature est maintenue à des fréquences élevées via des mécanismes de régulation spécifiques tels que l'inhibition du courant de type I_{AHP} , via l'activation de récepteurs Kainates par le glutamate ambiant (Segerstrale et al., 2010).

II.3. Une maturation postsynaptique précoce de certains groupes d'interneurones

Concernant la maturation postsynaptique, les synapses gabaergiques corticales se mettent en place, en général, avant les synapses glutamatergiques au niveau de la plupart des types cellulaires : au niveau des cellules pyramidales, des interneurones et des précurseurs des oligodendrocytes (Anderson et al., 1997; Tyzio et al., 1999; Wang and Kriegstein, 2008, figure 3). De plus, cette séquence de maturation synaptique concerne aussi les neurones qui sont générés et qui se développent au sein d'un environnement adulte au niveau du gyrus denté (Markwardt et al., 2009). Ainsi la séquence de maturation des récepteurs est très générale et indique probablement un mécanisme intrinsèque, cellule-autonome. Par ailleurs, une action inductive directe de la transmission GABAergique sur le développement des récepteurs AMPA fut récemment démontrée dans le néocortex (Wang and Kriegstein, 2008; Wang and Kriegstein, 2010) et dans l'hippocampe (Pfeffer et al., 2009). Cependant, il est important de noter qu'une maturation différentielle des synapses gabaergiques survient probablement le long des domaines somato-dendritiques des neurones avec un délai pour le développement des synapses gabaergiques somatiques (Chattopadhyaya et al., 2007; Fiorentino et al., 2009; Marty et al., 2002; Tyzio et al., 1999). Ainsi, au moins une partie du réseau d'interneurones gabaergiques démarre les processus de maturation synaptique quelques jours avant le réseau des cellules glutamatergiques, attribuant une fonction de réseau cruciale

à certaines populations d'interneurones. Une des preuves que certaines populations d'interneurones puissent remplir une fonction centrale de réseau fut apportée récemment par notre équipe qui a montré que quelques interneurones exceptionnels agissent comme des « hubs » de réseaux, c'est-à-dire qu'ils représentent des nœuds à forte connectivité transmettant et relayant le flux d'information à travers une arborisation axonale dense et étendue ainsi qu'une forte excitabilité intrinsèque et synaptique (Bonifazi et al., 2009). La modification de l'activité d'un seul interneurone « hub » peut synchroniser ou désynchroniser l'activité de centaines de neurones dans l'hippocampe en développement (Bonifazi et al., 2009).

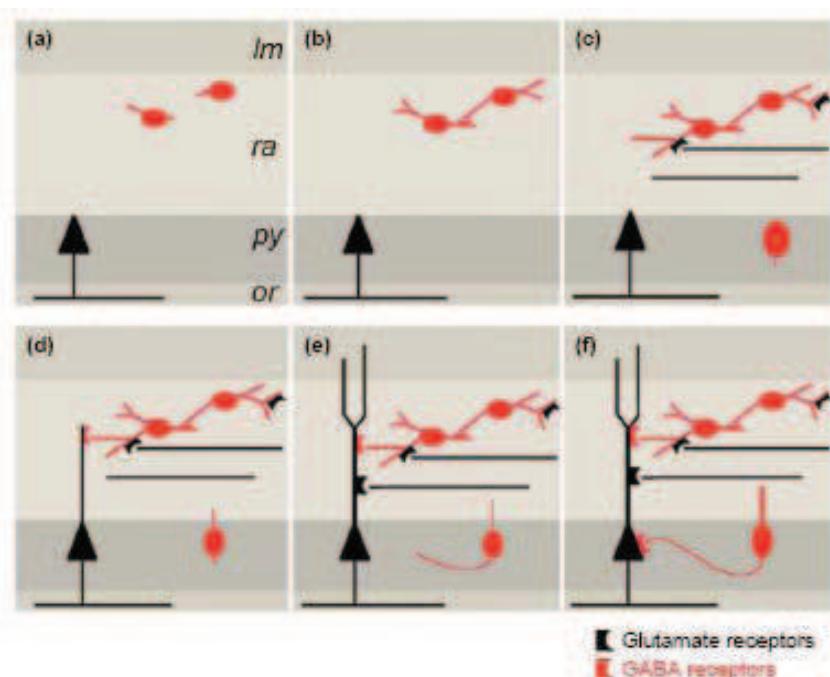


Figure 3: Mise en place séquentielle des synapses GABAergiques et glutamatergiques au sein des interneurones et des cellules pyramidales au cours du développement chez le rat.

Les interneurones sont représentés par des ovales rouges et les cellules pyramidales par des triangles noirs. Les 6 étapes de la figure schématisent la formation séquentielle des synapses mais ne prennent pas en compte son hétérogénéité. Les âges mentionnés représentent les âges où un nombre significatif de nouvelles synapses sont formées, en gardant à l'esprit que leur acquisition pour une population entière de neurones s'étend probablement sur 3 ou 4 jours. (a) Aucun des deux types neuronaux n'est innervé. (b,c) Les interneurones, mais pas les cellules pyramidales expriment les synapses GABAergiques (b) puis glutamatergiques (c). Notons que les axones glutamatergiques (noirs) forment sélectivement des synapses avec les interneurones et pas avec les dendrites des cellules apicales faiblement développées. Ces 3 étapes développementales ont lieu entre les jours embryonnaires E17 et E19. (d,e) Les cellules pyramidales expriment séquentiellement les synapses GABAergiques (d) et glutamatergiques (e) sur les dendrites apicales. Notons que les dendrites apicales des cellules pyramidales s'étendent progressivement dans le stratum radiatum (d) et le stratum lacunosum moleculare (e). Ces 2 étapes commencent probablement autour de E19 et continuent après la naissance. Les synapses entre les interneurones et le soma des cellules pyramidales sont formées plus tard, autour de 4 jours postnataux (f). Abréviations supplémentaires : lm, stratum lacunosum moleculare; or, stratum oriens; py, pyramidal cell layer; ra, stratum radiatum. Extrait de Ben-Ari et al., 2004.

II.4. Une caractéristique spécifique des interneurones immatures : leur dépolarisation par la transmission GABAergique.

Une autre raison de supposer une fonction de réseau importante pour certaines populations d'interneurones en développement provient du fait que la transmission GABAergique dépolarise et excite les neurones aux stades précoce du développement, dû au taux élevés de chlore intracellulaire (Ben Ari et al., 1989), lui-même dû au délai de maturation des transporteurs qui expulsent le chlore des cellules (transporteurs KCC2) par rapport aux transporteurs qui accumulent le chlore dans les cellules (transporteurs NKCC1) (Chudotvorova et al., 2005; Delpire, 2000; Payne et al., 2003; Rivera et al., 1999; Takayama and Inoue, 2010). Ce phénomène est observé au sein de la plupart des structures en développement et concerne la plupart des espèces (pour revue: Ben-Ari et al., 2007). Cependant, au sein d'une structure en développement, quelques neurones pourraient être excités alors que d'autres pourraient être inhibés par la transmission GABAergique, en fonction de leur charge intracellulaire de chlore ; cette hétérogénéité des concentrations intracellulaires de chlore fut observée grâce aux techniques d'imagerie du chlore (Glykys et al., 2009). De plus, il semble que les concentrations de chlore intracellulaire soient sensibles aux variations de l'environnement extracellulaire telles que des variations hormonales ou métaboliques. En effet, il a été montré qu'une augmentation de l'ocytocine, une hormone maternelle essentielle au moment de l'accouchement, déclencheait une réduction transitoire de la concentration intracellulaire de chlore et donc un changement de l'action du GABA qui devient transitoirement inhibiteur au cours de la naissance chez le rongeur (Tyzio et al., 2006). Plus récemment, il a été proposé que la constitution physiologique de l'ACSF pour les expérimentations utilisant les rats nouveau-nés, devrait contenir le métabolite des corps cétoniques (DL-BHB pour DL-3-hydroxybutyrate), du lactate et du pyruvate, plutôt que du glucose seul, afin de fournir l'énergie nécessaire aux cellules nerveuses immatures (Holmgren et al., 2010; Rheims et al., 2009). En effet le lait maternel serait enrichi en corps gras plutôt qu'en sucres. Les auteurs montrent qu'une telle composition de l'ACSF diminue la concentration de chlore intracellulaire et rend l'action du GABA inhibitrice. Ils suggèrent que les fortes concentrations de chlore intracellulaire et l'action dépolarisante du GABA au cours du développement, montrées au sein de nombreuses structures cérébrales et espèces animales (pour revue : Ben-Ari et al., 2007), traduirait un déficit énergétique du réseau neuronal immature. Cependant nous avons récemment testé cette hypothèse en imagerie et électrophysiologie (voir annexe I, article accepté dans *The Journal of Neuroscience*) et montré

que des concentrations physiologiques de DL-BHB, lactate et pyruvate, n'affectent pas l'action dépolarisante du GABA.

Il est important de souligner que les potentiels dépolarisants gabaergiques postsynaptiques diffèrent des potentiels dépolarisants transmis par les récepteurs AMPA postsynaptiques. En effet, la dépolarisation GABAergique reste généralement sous le seuil de déclenchement des potentiels d'action (Valeeva et al., 2010). Le déclenchement d'un potentiel d'action au cours d'une dépolarisation GABAergique nécessite en parallèle l'activation de conductances sodium persistantes (Valeeva et al., 2010). De plus, la fidélité temporelle de la réponse GABAergique immature est imprécise due à ses lentes cinétiques, et peut réduire la synchronisation neuronale (Valeeva et al., 2010). Aussi, il n'était pas connu, jusqu'à récemment, si la transmission GABAergique exerçait des actions excitatrices sur les interneurones eux-mêmes. En accord avec leur stade avancé de maturité, il est possible que les interneurones les plus âgés présentent une concentration de chlore intracellulaire plus basse que les cellules pyramidales, résultant en une hyperpolarisation des entrées gabaergiques (Banke and McBain, 2006) alors que les interneurones les plus jeunes seront toujours dépolarisés par la transmission GABAergique (Sauer and Bartos, 2010; Tyzio et al., 2008). Ces différences proviendraient d'une augmentation générale de l'expression des transporteurs KCC2 au sein des interneurones au cours du développement (Miyoshi and Fishell, 2010). Certains sous-types d'interneurones peuvent même présenter une homéostasie spécifique du chlore qui s'étend jusqu'à l'âge adulte, par exemple, le GABA est excitateur au niveau des interneurones contenant le neuropeptide Y (NPY) de la région du hile du gyrus denté chez la souris adulte (Fu and van den Pol, 2007).

Ainsi, il semble que la maturation précoce de la population des interneurones gabaergiques attribue à certains d'entre eux une fonction de réseau précoce unique et ainsi une contribution majeure dans les processus de développement dépendant de l'activité.

Chapitre III. Les patrons d'activité neuronale corrélée des structures du système nerveux en développement partagent des principes d'organisation et de maturation communs.

Bien que les patrons d'activité neuronale corrélée soient variables en terme de dynamique spatio-temporelle, chaque structure du système nerveux, aussi bien central que périphérique, les expriment au cours du développement (pour revue : Blankenship and Feller, 2010). Dans l'introduction générale, nous avions émis l'hypothèse qu'une telle universalité pourrait indiquer que les structures neuronales partagent des principes d'organisation et de maturation communs. Une première observation qui apporte un argument en faveur de notre hypothèse est l'organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée du développement, commune à la rétine, à la moelle épinière, à l'hippocampe et probablement au néocortex (voir la table I).

	Rétine	Cochée	Moelle épinière	Cervelet	Hippocampe		Néocortex
Patrons	Vagues rétinennes	Bouffées périodiques de PA	Activité électrique rythmique spontanée	Activité électrique rythmique spontanée	Vagues de PA propagées de l'Apex vers la base	SPAs	GDPs
	Stade I	Stade II	Stade III				Oscillations calciques spontanées et synchronisées des cellules de la VZ
Age	E16-P0	P0-P10	P10-P14	P7-P10	E11-E15	E15-E18	P4-P6
Mécanismes	Jonctions gap	Syn + Extrasyn (Ach)	Syn + Extrasyn (Glu)	Syn ? Non syn ? (Ach + GABA dépolarisé + Gly dépolarisé libérée par les cellules radiaires + Jonctions gap ?)	Syn (Glu + GABA dépolarisé + Gly dépolarisé)	Syn (GABA dépolarisé)	Syn (GABA dépolarisé)
Réseau	inconnu	inconnu	inconnu	inconnu	Régulier (local)	Sans échelle	Sans échelle ?

Figure 1

Table 1 : Résumé des patrons d'activité neuronale corrélée de différentes structures cérébrales au cours du développement chez le rongeur.
 Syn: synaptique; Ach: acétylcholine; Glu: glutamate; dépolarisant ; mGluR : Récepteurs métabotropique au glutamate ; IP3 : inositol tri-phosphate ; PA : potentiel d'action ; VZ : zone ventriculaire.

III.I. Une organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale spontanés au cours du développement

III.I.I Organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée de la rétine en développement

Au niveau de la rétine, la séquence est constituée de vagues rétiniennes spontanées qui se succèdent en trois étapes stéréotypées, caractérisées par des mécanismes et des dynamiques distincts (Syed et al., 2004).

- Au cours du stade I, les vagues rétiniennes sont portées principalement par les jonctions gap; leur dynamique diffère en fonction de l'espèce étudiée : chez le lapin, les vagues du stade I sont très rapides et balayent toute la zone rétinienne étudiée (Syed et al., 2004) ; chez la souris, les vagues du stades I sont locales et leur propagation est limitée dans l'espace (Bansal et al., 2000).

- Au cours du stade II, les vagues sont portées par l'activation synaptique des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (nACh) ; ces vagues du stade II ont été les plus étudiées et semblent très similaires d'une espèce animale à l'autre : elles sont initiées dans l'espace rétinien de manière aléatoire et se propagent au sein de régions différentes de la rétine (Bansal et al., 2000;Feller et al., 1996;Syed et al., 2004).

- Au stade III, les vagues s'expriment via la transmission synaptique et extrasynaptique glutamatergique (Blankenship et al., 2009;Syed et al., 2004;Torborg and Feller, 2005) ; leur dynamique est différente selon l'espèce : chez le lapin, leur fréquence est plus basse (intervalle inter-vagues : ~0.2 s) que celle des vagues du stade II (intervalle inter-vagues : ~113 s) et ne semblent pas se propager (Syed et al., 2004); chez la souris, au contraire, les vagues du stade III sont plus fréquentes (intervalle inter-vagues : ~110s au stade III versus ~40 s au stade II) et présentent une plus grande vitesse de propagation que les vagues des stades précédents (Bansal et al., 2000;Muir-Robinson et al., 2002).

Une caractéristique importante de cette séquence est que l'inhibition du système de neurotransmission d'un stade donné restaure les vagues du stade précédent ou accélère l'apparition des vagues du stade suivant (Blankenship et al., 2009;McLaughlin et al., 2003;Stacy et al., 2005;Syed et al., 2004).

- Les souris mutantes n'ayant pas l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine au niveau de la rétine, exprimeront le stade I des vagues rétiniennes dépendantes des jonctions gap au cours

de la période développementale qui est normalement dominée par les vagues cholinergiques du stade II (Stacy et al., 2005).

- De même, aux stades de maturation des patrons d'activité rétiniens suivants, l'absence de transmission glutamatergique des cellules bipolaires chez les souris KO VGLUT1, retarde la transition entre stades II et III (Blankenship et al., 2009).
- Enfin, les souris n'ayant pas la sous-unité $\beta 2$ du récepteur nicotinique à l'acétylcholine qui transmet les vagues du stade II, ne présenteront pas d'activité corrélée dépendante de ces récepteurs et les vagues glutamatergiques du stade III seront exprimées plus tôt (McLaughlin et al., 2003).

Une telle séquence, où les patrons d'activité neuronale corrélée se succèdent au cours de périodes précises et s'excluent mutuellement au sein du réseau, s'applique aussi à l'hippocampe en développement (Crepel et al., 2007).

III.I.2 Organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée de l'hippocampe en développement

L'hippocampe exprime deux patrons d'activité neuronale corrélée qui se succèdent au cours de la première semaine postnatale: les SPAs (Crepel et al., 2007) assemblées de neurones produisant des plateaux calciques synchronisés par jonction gap, suivis des GDPs (Ben Ari et al., 1989; Crepel et al., 2007; Garaschuk et al., 1998) qui synchronisent un grand nombre de neurones par transmission synaptique GABAergique. De plus, l'occurrence des GDPs stoppe activement l'expression des SPAs et, comme pour les stades rétiniens successifs, le blocage de l'un, ici des GDPs, peut restaurer le précédent : les SPAs (Crepel et al., 2007).

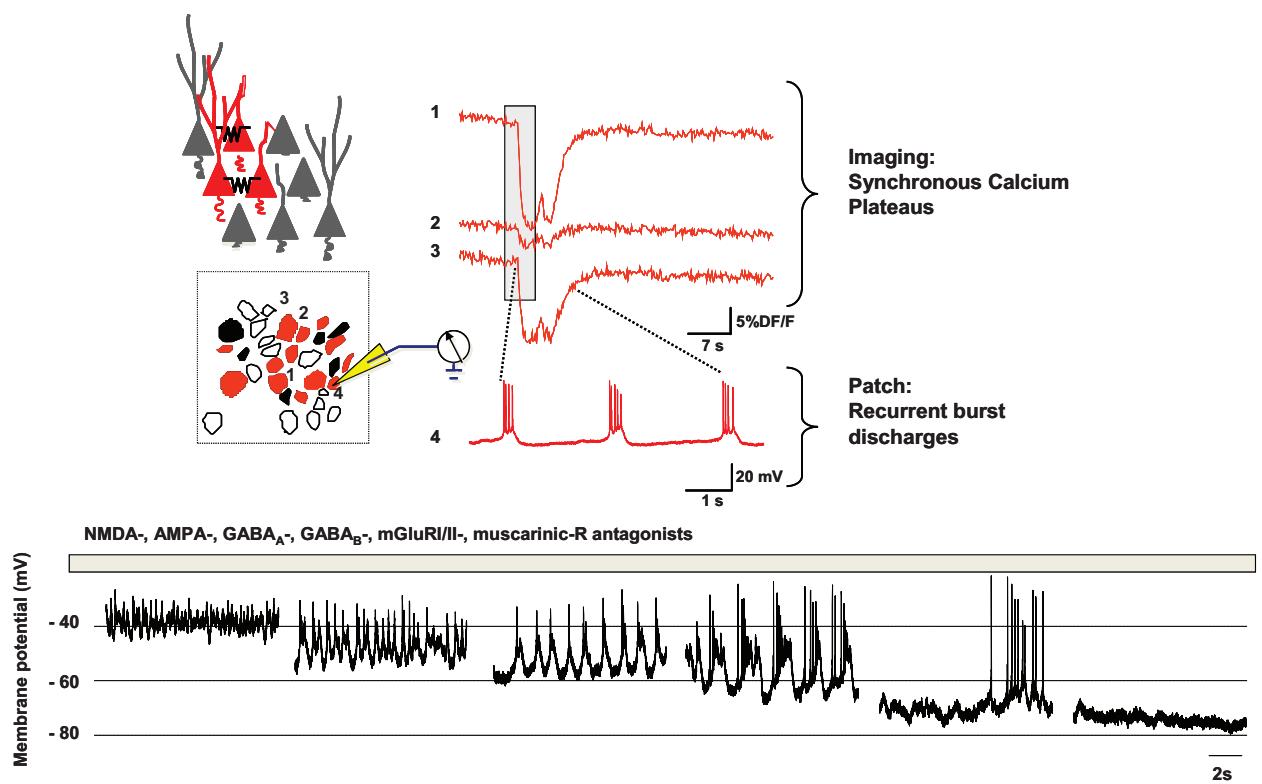


Figure 4 : Le SPA : assemblées de neurones produisant des plateaux calciques synchronisés par jonctions gap. Le schéma représente une assemblée de cellules SPA couplées par jonctions gap, en dessous, la carte des contours cellulaires est extraite d'une expérience d'imagerie calcium et indique les cellules SPA (rouges) et les autres cellules actives (noires) au sein d'une région contenant une assemblée de cellules SPA numérotées de 1 à 4. Les tracés de fluorescence calcium de ces cellules sont représentés à droite par les numéros correspondants. Notons la synchronisation des plateaux calciques. Le tracé du bas correspond à l'enregistrement électrophysiologique en mode courant imposé de l'activité typique d'un neurone SPA. En dessous : enregistrements en courant imposé à différents potentiels membranaires de cellules détectées en imagerie calcium comme étant des cellules SPAs. Notons que l'activité SPA est altérée aux valeurs de potentiels en dessus de -55mV et en dessous de -65 mV. Les cellules étaient enregistrées à P2 en présence des antagonistes des récepteurs NMDA, AMPA, GABA_A, GABA_B, mGluRI/II, muscariniques.

Extrait de Crepel et al., 2007.

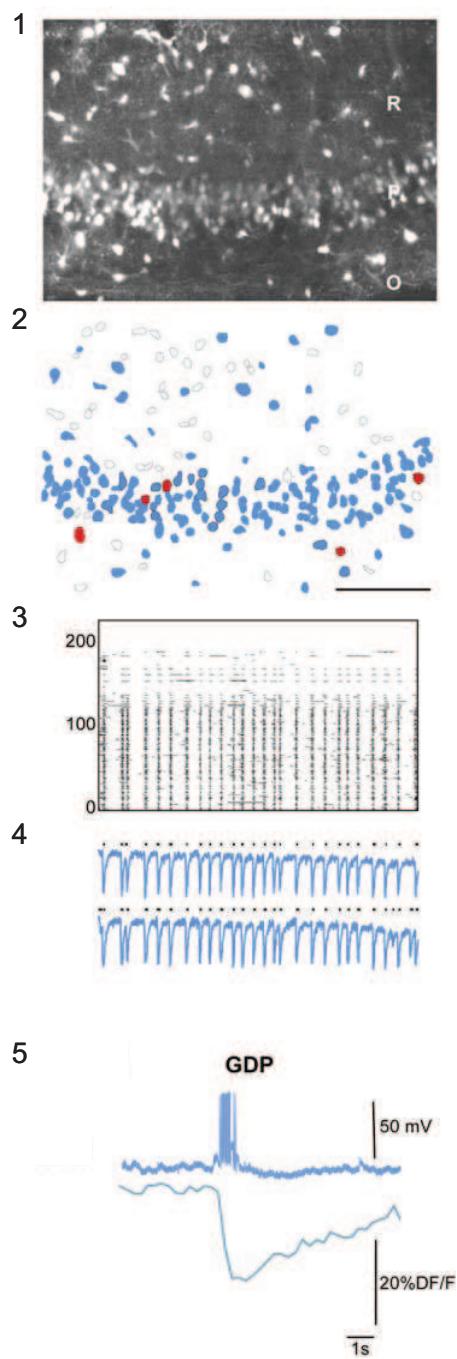


Figure 5 : GDPs détectés en imagerie calcium bi-photon.

1. Image de la fluorescence calcium obtenue par microscopie bi-photon multi-neuronale de la région CA1 de tranches d'hippocampe chez la souris à P6. Les contours des cellules sont automatiquement détectés à partir de l'image de la fluorescence : les contours cerclés de noirs représentent les cellules silencieuses, les contours pleins rouges représentent les cellules produisant des plateaux calcium (cellules SPA) et les contours pleins bleus représentent les cellules produisant des événements calciques rapides et synchrones (cellules GDPs). Barre d'échelle : 100 µm. 3. Rasterplot en fonction du temps de l'activité du film illustré en (1.) chaque ligne représente une cellule unique et chaque tracé horizontal, la durée de l'évènement calcium. 4. Traces de la fluorescence calcium représentative des cellules GDPs. 5. Enregistrements électrophysiologiques en mode courant imposé ($V_{rest} \sim -60$ mV, en haut) et enregistrements optiques (en bas) d'une cellule GDP.
Extrait de Crepel et al., 2007.

III.1.3 Organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée du néocortex en développement.

Concernant le néocortex en développement, une très grande variété de patrons d'activité neuronale corrélée a été décrite (Adelsberger et al., 2005;Corlew et al., 2004;Dupont et al., 2006;Garaschuk et al., 2000;Kandler and Katz, 1998;Khazipov et al., 2004;McCabe et al., 2006;Milh et al., 2007b;Opitz et al., 2002;Owens and Kriegstein, 1998;Peinado, 2000;Voigt et al., 2001;Weissman et al., 2004;Yuste et al., 1992;Rheims et al., 2008a). Cette variété est en partie le résultat d'une multiplicité d'approches expérimentales et de modèles animaux utilisés pour étudier les activités de réseau au cours du développement. En effet, la majorité des études sont effectuées en condition *in vitro* (Owens and Kriegstein, 1998 ; Weissman et al., 2004; Yuste et al., 1992 ; Garaschuk et al., 2000 ; Rheims et al., 2008; Kandler and Katz, 1998 ; Corlew et al., 2004 ; McCabe et al., 2006 ; Sun and Luhmann, 2007), qui désigne ici les préparations où le tissu est maintenu en survie artificielle et qui préserve l'organisation du réseau, contrairement aux préparations de cellules dissociées (Opitz et al., 2002;Voigt et al., 2001). D'autres études de l'activité de réseau au cours du développement néocortical ont été effectuées *in vivo* (Adelsberger et al., 2005;Golshani et al., 2009;Khazipov et al., 2004;Milh et al., 2007b;Milh et al., 2007a). De plus, certains groupes induisent l'activité par des manipulations pharmacologiques (Dupont et al., 2006;Peinado, 2000;Peinado, 2001;Yuste et al., 1995). Par souci de clarté, nous considérons dans la table I uniquement les activités spontanées (i.e. non induites par des manipulations pharmacologiques) et obtenues en condition *in vitro* puisqu'il s'agit de la condition la plus utilisée, notamment dans nos études, présentées dans la partie résultats. Enfin, nous rassemblons sous un même nom les activités décrites par différents groupes mais qui semblent identiques d'un point de vue de leurs caractéristiques spatio-temporelles et de leurs mécanismes. Une telle sélection réduit la multitude d'activité néocorticale du développement à quatre grands patrons d'activité neuronale corrélée décrits entre la fin du stade embryonnaire et la seconde semaine postnatale (Table I). Les deux premiers patrons d'activité neuronale du néocortex en développement sont produits de manière intracellulaire sans aucun corrélat électrique, leur mesure étant permise par l'utilisation de techniques d'imagerie calcium (Kandler and Katz, 1998;Owens and Kriegstein, 1998;Weissman et al., 2004;Yuste et al., 1992).

- Il s'agit, au stade embryonnaire, d'oscillations calciques spontanées et corrélées des cellules gliales radiaires, précurseurs neuronaux au sein de la VZ, pouvant se propager sous forme de vagues (Owens and Kriegstein, 1998;Weissman et al., 2004). Cette activité non

électrique est produite par une augmentation d'inositol trisphosphate (IP3) qui permet la libération de Ca^{2+} des stores intracellulaires, ainsi que par les jonctions gap.

- Le second patron d'activité calcique non-électrique apparaît au cours de la première semaine postnatale au sein du manteau cortical. Il est aussi produit par l'activation de l'IP3 permettant la libération de Ca^{2+} des stores intracellulaires et par les jonctions gap. Les auteurs ont également montré que l'activation d'IP3 était liée à la stimulation des mGluRs. Cette activité est synchronisée au sein de groupes locaux de neurones, elle est alors appelée « domaine » (Yuste et al., 1992 ; Kandler and Katz, 1998).

- Un autre patron d'activité neuronale corrélée et spontanée a été également décrit au cours de la première semaine postnatale dans le manteau cortical. Cependant, contrairement aux domaines qui sont exprimés très localement, ce patron implique la totalité du cortex, qu'il envahit progressivement en lui donnant l'allure d'une vague. Ces vagues calciques, décrites en conditions *in vitro* et *in vivo*, sont appelées ENOs (pour « Early Network Oscillations », (Adelsberger et al., 2005;Corlew et al., 2004;Garaschuk et al., 2000, voir figure 6). Elles oscillent à basse fréquence (0.01Hz) et sont transmises par les synapses glutamatergiques. Leur apparition décline à la fin de la première semaine postnatale, période durant laquelle les GDPs commencent à être observés dans les couches les plus profondes du cortex (Rheims et al., 2008).

- Les GDPs du cortex (Rheims et al., 2008) semblent identiques à ceux de l'hippocampe (Ben Ari et al., 1989;Crepel et al., 2007;Garaschuk et al., 1998) puisqu'il s'agit d'oscillations récurrentes transmises principalement par le GABA dépolarisant.

Il est difficile, dans l'état actuel des connaissances, de parler d'une séquence de patrons d'activité neuronale au même titre que les séquences de la rétine et de l'hippocampe puisque les patrons d'activité neuronale du néocortex en développement ont toujours été observés individuellement au sein d'études différentes. Nous verrons plus loin dans le manuscrit que le premier résultat obtenu au cours de cette thèse nous aura permis de mettre en évidence l'existence du patron d'activité neuronale SPA au sein du néocortex et de clarifier la succession des patrons d'activité neuronale corrélée du néocortex au cours de la première semaine postnatale.

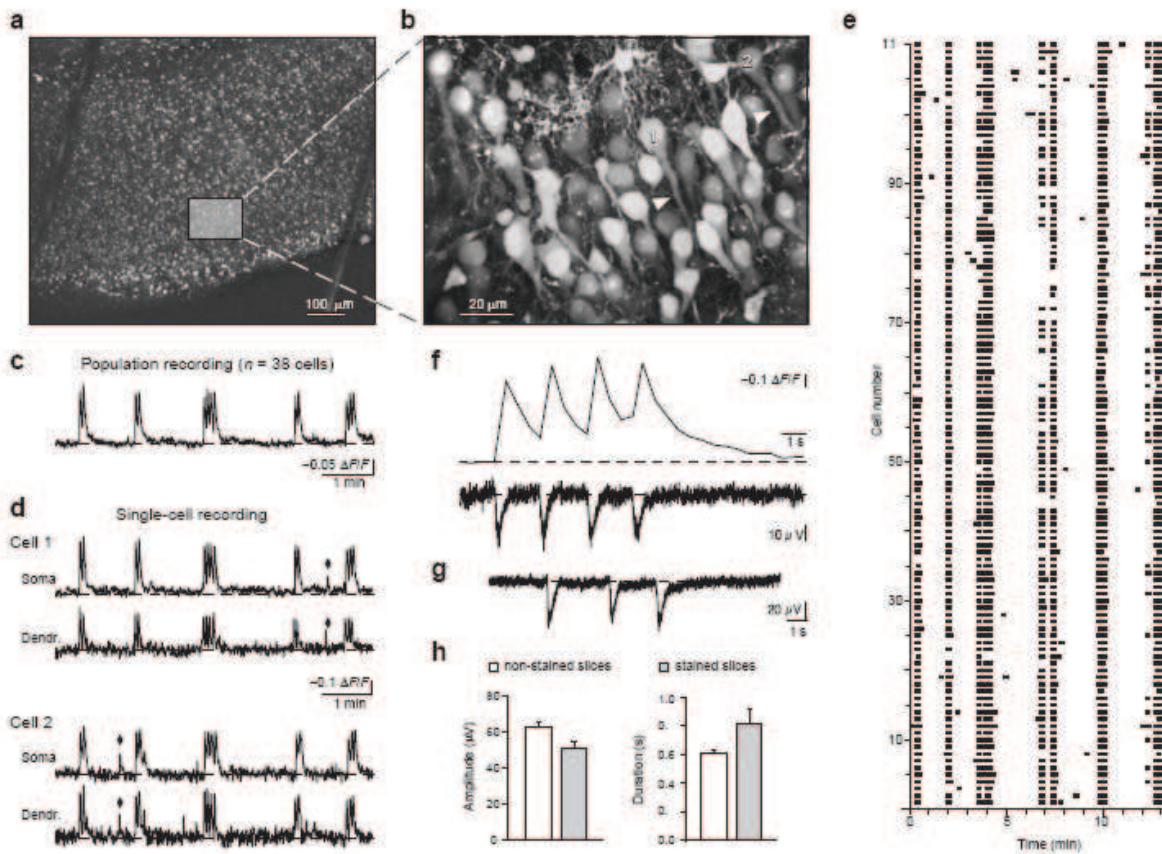


Figure 6 : ENOs : oscillations calciques à grande échelle exprimées dans le néocortex de rongeur au cours des premiers jours postnataux.

(a) Image de la fluorescence calcium obtenue au microscope bi-photon avec un objectif $\times 10$ d'une tranche de cortex temporal chez le rat à P3. La région délimitée est présentée à plus fort grossissement en (b). Barre d'échelle : 100 μm . (b) Image de la fluorescence calcium de la couche II/III montrant les cellules individuelles. Le signal calcium des cellules numérotées 1 et 2 est montré en (d). Barre d'échelle : 20 μm . (c) Enregistrements des variations de calcium de la population neuronale obtenu en moyennant les événements calcium associés aux ENOs de 38 neurones individuels qui peuvent être clairement distingués de (b). (d) enregistrements des variations de calcium du soma et des dendrites de deux cellules corticales (correspondant aux sites marqués en b). Notons que les variations de calcium intracellulaire associées aux ENOs détectées au sein des neurones individuels sont synchronisées avec celles observées dans l'enregistrement de la population (c). Les losanges indiquent les événements calcium asynchrones. (e) événements calcium enregistrés simultanément dans 110 cellules. Les données ont été réduites en forme binaire et seuls les événements dépassant au moins 4 fois le seuil (racine carrée de la fluorescence de base des cellules individuelles) sont considérés. (f) Réponse calcium de la population (tracé du haut) et changements du potentiel de champ (tracé du bas) enregistrés simultanément dans la même région du cortex temporal d'un rat âgés de 5 jours. (g) Enregistrements du potentiel de champ du cortex temporal d'une tranche non chargée de fluorescence calcium obtenue chez un rat à P4. (h) Les barres sous les tracés indiquent les amplitudes moyennes (gauche) et les durées (droites) des changements de potentiel de champ associé aux ENOs mesurés au sein de tranches non fluorescentes ($n = 5$, 304 événements) et chargées de fluorescence Fura-2 AM ($n = 4$, 47 événements).

Extrait de Garaschuk et al., 2000.

III.1.4 Organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée de la moelle épinière en développement.

Concernant la moelle épinière, nous avons exclu de la table I, les activités décrites en condition de stimulation électrique ou de manipulation pharmacologique et en cultures de cellules dissociées et cultures de tranches organotypiques, lesquelles, selon leurs auteurs, ne reflètent pas nécessairement les processus développementaux naturels d'une moelle épinière intacte (Sibilla et al., 2009). Ainsi nous pensons pouvoir comparer les activités de réseau des différentes structures cérébrales en réduisant au maximum les différences qui seraient dues aux conditions expérimentales. Cette démarche nous a conduit à considérer deux patrons d'activité neuronale successifs au sein de la moelle épinière embryonnaire chez les rongeurs (Demir et al., 2002; Hanson and Landmesser, 2003; Momose-Sato et al., 2007; Nakayama et al., 1999; Nakayama et al., 2002; Nishimaru et al., 1996; Ren and Greer, 2003; Scain et al., 2010).

- Le premier patron d'activité neuronale s'exprime entre E11 et E15, lorsque les motoneurones commencent à innerver leurs cibles périphériques, les jonctions neuromusculaires n'étant pas encore fonctionnelles. Ce premier patron est produit par plusieurs acteurs dont les principaux sont : (i) les motoneurones libérant l'acétylcholine qui va activer les interneurones et les motoneurones adjacents (Hanson and Landmesser, 2003; Ren and Greer, 2003) ; (ii) les interneurones GABA qui libèrent le GABA, dépolarisant à ce stade (Hanson and Landmesser, 2003; Ren and Greer, 2003); (iii) les cellules radiaires qui libèrent la glycine dépolarisante sur les neurones et modulent ainsi la propagation de l'activité (Scain et al., 2010), enfin, (iv) les jonctions gap ont une implication hypothétique dans la genèse et la propagation de l'activité (Hanson and Landmesser, 2003) puisque seul un agent pharmacologique, la carbenoxolone, peu sélective (pour revue : Juszczak and Swiergiel, 2009) a été utilisée pour tester leur implication.

- Le second patron d'activité neuronale, exprimé entre E15 et E18, nécessite, en plus des agents impliqués dans le premier patron, les interneurones glutamatergiques qui activent les récepteurs ionotropiques non-NMDA par transmission synaptique. Ce patron représente la dernière étape avant le changement de polarité de l'action du GABA et de la glycine qui passent de dépolarisants à inhibiteurs (Ren and Greer, 2003; Nakayama et al., 1999; Nishimaru et al., 1996).

Que ce passe-t-il si l'un des deux patrons d'activité neuronale corrélée de la moelle épinière est bloqué ? Myers et ses collaborateurs ont montré que les souris mutantes n'ayant pas l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine présenteront, au moment où le premier patron

aurait dû s'exprimer, une activité spontanée transmise par le glutamate et une action inhibitrice de la glycine, deux aspects qui rappellent le second patron d'activité neuronale de la moelle en développement (Myers et al., 2005). Ainsi le blocage du premier patron accélère l'apparition du second. Une autre étude réalisée chez le poulet,, a montré que le blocage du système glutamatergique et acétylcholinergique engendre un patron d'activité neuronale dépendant de la glycine et du GABA dont l'action est redevenue excitatrice, caractéristique du premier patron (Chub and O'Donovan, 1998). La moelle épinière présente donc une séquence de patron d'activité neuronale corrélée au même titre que celle de la rétine et de l'hippocampe, puisqu'elle se caractérise par la restauration du patron précédent ou l'apparition du suivant lorsque le système de neurotransmission d'un patron donné est inhibé.

Ainsi plusieurs structures en développement partagent un principe d'organisation notable, celui d'exprimer une séquence précise de patrons d'activité neuronale corrélée distincts. Notons que les deux autres structures présentées dans la table I, ne semblent pas présenter de séquence puisqu'un seul patron d'activité neuronale spontanée a été décrit au sein de la cochlée (Gummer and Mark, 1994;Jones et al., 2001;Jones et al., 2007;Lippe, 1994;Sonntag et al., 2009;Tritsch et al., 2010;Tritsch and Bergles, 2010) et du cervelet (Watt et al., 2009) en développement. Cependant les caractéristiques de ces patrons d'activité neuronale uniques présentent d'importantes similarités avec les patrons d'activité neuronale successifs des autres structures et constituent un second argument en faveur de l'existence d'un principe d'organisation et de maturation commun des structures neuronales, présenté ci dessous.

III.2. Les activités électriques du développement sont spontanées, phasiques et propagées.

Les bouffées périodiques de potentiels d'action (PA) de la cochlée, les vagues de PA du cervelet, l'activité électrique rythmique de la moelle épinière, les ENOs du néocortex et les vagues rétiniennes sont toutes des activités de réseau électriques, rythmiques et spontanées ; en d'autres termes, ces réseaux ont en commun d'exprimer naturellement une activité électrique qui se propage à la manière d'une vague au sein de la quasi-totalité de leurs neurones, en alternance avec des périodes de silence relatif.

De plus, la plupart de ces structures en développement possède des neurones de type pacemaker dont le potentiel membranaire est instable et dont l'action, combinée avec les interactions neuronales au sein du réseau, produit l'activité spontanée de réseau (i.e. qui survient même en cas d'absence d'entrées synaptiques) et impose le rythme. Tel est le cas au

cours du développement de l'hippocampe, où les GDPs sont déclenchés par une interaction entre les cellules pyramidales de CA3 et les interneurones GABAergiques. Les cellules pyramidales de CA3 déchargent des bouffées de potentiels d'action périodiques initiées par l'action dépolarisante du GABA (Ben Ari et al., 1989;Sipila and Kaila, 2008), ces décharges en bouffée de type pacemaker des cellules pyramidales de CA3 sont induites, comme au stade adulte, par un courant sodium persistant et sont terminées par une AHP (After HyperPolarisation) lente, elle-même induite par une conductance potassique activée par le calcium (Sipila et al., 2005;Sipila et al., 2006).

Une organisation similaire de l'activité de réseau impliquant des neurones de type pacemaker existe également au cours du développement du cervelet (Raman et al., 1997), du néocortex (Lischalk et al., 2009) et de la rétine (Butts et al., 1999;Zheng et al., 2006). Cependant, le rythme de l'activité spontanée de la rétine en développement n'est pas donné par les conductances membranaires du réseau de neurones de type pacemaker, comme dans le cas du cervelet et de l'hippocampe. Dans le cas de la rétine, le rythme émerge de l'interaction entre la connectivité du réseau et les propriétés ses neurones de type pacemaker de la rétine (Butts et al., 1999;Godfrey and Swindale, 2007;Zheng et al., 2006). Les vagues rétiennes précoces sont initiées par une classe d'interneurones cholinergiques appelés cellules amacrines « starburst » (Zhou, 2001). En absence d'entrées synaptiques, les cellules amacrines starburst sont spontanément et régulièrement (toutes les 15 s) dépolarisées (Zheng et al., 2006). Il a été proposé que cellules amacrines starburst, qui sont fortement interconnectées par les synapses cholinergiques excitatrices, se dépolarisent entre elles, et génèrent ainsi les vagues rétiennes (Zheng et al., 2004). Au cours de ces vagues, les cellules amacrines starburst subissent une large dépolarisation qui cause un large influx de calcium. Le calcium déclenche une AHP lente, calcium dépendante, qui suit la dépolarisation associée à la vague et dure entre 15 et 30 s (Zheng et al., 2006), cette durée est approximativement celle de l'intervalle minimum entre deux vagues.

Enfin, à notre connaissance et contrairement aux structures mentionnées ci-dessus, aucun neurone de type pacemaker n'a été identifié au sein de la moelle épinière en développement.

III.3. Les mécanismes sous-jacents aux activités du développement

Les mécanismes grâce auxquels ces activités sont exprimées constituent un troisième point commun dans le principe d'organisation des différentes structures cérébrales.

III.3.1. Les jonctions gap aux stades précoces du développement

Il semble qu'aux stades du développement les plus précoce, principalement aux stades embryonnaires chez le rongeur, le mécanisme commun à l'expression des premières activités de la rétine (Bansal et al., 2000; Syed et al., 2004; Torborg and Feller, 2005), de l'hippocampe (Crepel et al., 2007) et du néocortex (Owens and Kriegstein, 1998 ; Weissman et al., 2004 ; Yuste et al., 1992 ; Kandler and Katz, 1998) soient les jonctions gap.

III.3.2 La transmission synaptique succède les jonctions gap

Ensuite, aux stades plus tardifs, principalement aux cours de la première semaine de vie postnatale chez le rongeur, l'activité est portée par la transmission synaptique. Plus précisément, on constate que la plupart des structures du système nerveux central étudiées ici, présentent au moins un patron d'activité neuronale porté par le GABA (et la glycine pour la moelle épinière) dépolarisant (Hanson and Landmesser, 2003 ; Scain et al., 2010 ; Watt et al., 2009 ; Ben-Ari et al., 1989 ; Ben-Ari et al., 2007 ; Rheims et al., 2008). Seules la rétine (Syed et al. 2004; Torborg and Feller, 2005) et la cochlée (Tritsch et al., 2007) utilisent plutôt le glutamate. Nous verrons dans le chapitre suivant le rôle probable joué par ces neurotransmetteurs au cours de la maturation des réseaux neuronaux.

III.4. Une topologie de réseau similaire entre les différentes structures cérébrales ?

Enfin, les dynamiques de ces activités de réseau sont souvent, comme nous l'avons déjà mentionné plusieurs fois, phasiques (les intervalles inter-événements vont de quelques secondes à quelques minutes (maximum 3 min, au niveau de la moelle épinière), en fonction de la structure cérébrale et du stade développemental et sont plus ou moins propagées (d'où le terme de « vagues » employés pour désigner les patrons d'activité neuronale se propageant relativement lentement sur de grandes distances telle que les ENOs qui envahissent l'ensemble du manteau cortical à 2 mm/s). De plus, d'après la théorie des graphes, les dynamiques des activités d'un réseau sont fortement influencées par la structure anatomique sous-jacente ou « topologie » du réseau (Barahona and Pecora, 2002; Boccaletti et al., 2006; Feldt et al., 2010; Wang and Chen, 2002). La structure anatomique d'un réseau neuronal se définit par les types de neurones qui constituent le réseau et par les types de connexions qui lient les neurones entre eux. Les connexions peuvent être locales, dans ce cas la topologie du réseau est qualifiée de « régulière » ; les connexions peuvent être aléatoires : « topologie aléatoire » ou les connexions peuvent être principalement locales

mais avec quelques raccourcis permis par des connexions à longue-portée : « topologie sans échelle ». Un réseau ayant une topologie régulière présentera une activité qui va parcourir tout le réseau à la manière d'une vague ; un réseau ayant une topologie aléatoire présentera une activité très synchronisée sur l'ensemble du réseau et un réseau avec une topologie sans échelle présentera une gamme de dynamiques d'activité intermédiaires (Barahona and Pecora, 2002;Boccaletti et al., 2006). On pourrait alors supposer que les structures présentées ici qui possèdent des activités spontanées toujours sous forme de vagues telle que la rétine, la cochlée, la moelle épinière et le cervelet, présentent une topologie régulière. Cependant, seules les études expérimentales ayant mis en évidence directement la structure anatomique d'un réseau fonctionnel donné, peuvent conclure sur la topologie. A notre connaissance, seules deux études récentes ont directement montré la topologie du réseau et son lien dans la dynamique de l'activité fonctionnelle au cours du développement. Il s'agit d'une étude effectuée au sein de notre équipe et qui a montré que la topologie des tranches *in vitro* d'hippocampe en développement était sans échelle avec des neurones GABAergique « hubs » fortement connectés transmettant et synchronisant l'activité de plusieurs centaines de neurones (Bonifazi et al., 2009). L'autre étude, effectuée par Hausser et collaborateurs, montre que le cervelet en développement présente une topologie régulière permettant l'expression d'activité sous forme de vagues régulières (Watt et al., 2009). Bien qu'il n'existe pas de données expérimentales concernant la topologie du réseau néocortical, plusieurs études théoriques ont émis l'hypothèse qu'il présenterait également une topologie sans échelle (Boccaletti et al., 2006;Buzsaki, 2004;Masuda and Aihara, 2003;Sporns et al., 2000;Sporns and Zwi, 2004). De plus, étant donné que certain patrons d'activité neuronale corrélée du néocortex en développement tel que les GDPs, ainsi que les sous-types neuronaux du néocortex (Rheims et al., 2008, Markram et al., 2004) et de l'hippocampe (Ben-Ari et al., 1989 ; Freund and Buzsaki, 1996) semblent très similaires, on peut poser l'hypothèse que le néocortex présente aussi une topologie sans échelle .

Chapitre IV. Les rôles des activités neuronales au cours du développement.

Il est difficile de définir précisément le rôle des patrons d'activité neuronale corrélée du développement répertoriés précédemment (dans la partie III de l'introduction). En effet, les études qui examinent ces activités sont essentiellement descriptives, c'est-à-dire que leurs auteurs rapportent les caractéristiques spatio-temporelles et les mécanismes de génération de ces patrons d'activité neuronales spontanés mais ne font que suggérer leur rôle possible au cours du développement. Par ailleurs, d'autres types d'études, dont l'objectif est d'examiner le rôle de l'activité dans le développement des circuits neuronaux, utilisent des manipulations, pharmacologiques ou génétiques, qui en principe altèrent les patrons d'activité neuronale spontanés. Cependant, bien que ces études n'apportent pas de preuves directes, elles fournissent des indices sur la manière dont l'activité peut être impliquée dans les processus du développement (pour exemple : figure 7), de la prolifération neuronale à l'affinement des circuits neuronaux fonctionnels. L'objectif de ce chapitre n'est pas de dresser une liste exhaustive du rôle de l'activité dans ces processus mais plutôt de reprendre quelques exemples particulièrement convaincants de son implication dans chaque processus développemental.

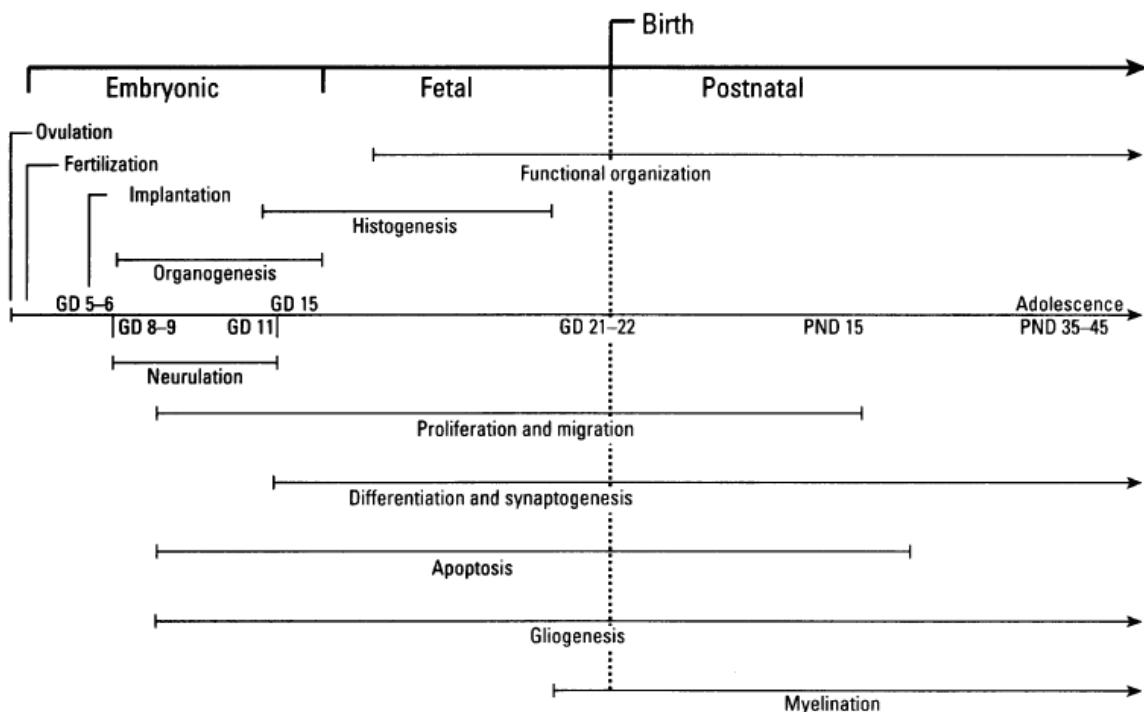


Figure 7: Profil temporel des principaux grands processus développementaux du cortex cérébral chez le rat.
Extrait de Rice and Barone, 2000.

IV.1. Le rôle de l'activité dans la prolifération neuronale

Nous avons vu précédemment (voir la partie III de l'introduction) que la zone ventriculaire corticale était le siège d'une activité calcique multi-neuronale spontanée et non électrique (Owens and Kriegstein, 1998 ; Weissman et al., 2004) entre E14 et E20 chez le rat, ce qui correspond à la période de neurogenèse. L'interruption de la propagation des vagues calciques à travers les cellules gliales radiaires embryonnaires qui sont les progéniteurs neuronaux, diminue la prolifération neuronale de la zone ventriculaire chez le rat (Weissman et al., 2004). Une étude précédente avait montré qu'au cours de cette période, le GABA et le glutamate agissant respectivement via les récepteurs GABA_A et AMPA/Kainate, dépolarisent les cellules progénitrices corticales de la zone ventriculaire, stimulant ainsi des élévations de calcium intracellulaire qui vont diminuer le nombre de cellules en phase S du cycle de division cellulaire (LoTurco et al., 1995). Les auteurs suggèrent ainsi un rôle de régulateur de la prolifération neuronale de la part des neurotransmetteurs endogènes (LoTurco et al., 1995). Au contraire, le GABA dépolarisant qui active les canaux calcium, favorise la prolifération des cellules granulaires du cervelet immature chez le rat postnatal (Fiszman et al., 1999). Contrairement au rat, une étude a montré que le GABA et le glutamate augmentaient la prolifération des cellules de la zone ventriculaire chez la souris (Haydar et al., 2000). Cependant, cette étude montre aussi qu'au sein de la zone sous-ventriculaire le GABA réduit la prolifération des cellules embryonnaires (Haydar et al., 2000). De plus, la libération de GABA par les neuroblastes différenciés dépolarise leur cellule progénitrice et limite leur prolifération (Liu et al., 2005), expliquant probablement la diminution de la prolifération des cellules embryonnaires de la zone sous-ventriculaire (Haydar et al., 2000).

Ainsi, l'action positive ou négative des neurotransmetteurs, et en particulier du GABA, dans la prolifération neuronale semble varier en fonction de la structure cérébrale et/ou de l'espèce animale étudiée. Néanmoins, toutes ces études suggèrent que ces neurotransmetteurs modulent la prolifération neuronale.

IV.2. Le rôle de l'activité dans la migration neuronale

Chez la souris, le glutamate stimule les mouvements chimiotactiques des cellules néocorticales de la zone ventriculaire via l'activation des récepteurs NMDA (Behar et al., 1999) et le GABA réduit la vitesse de migration des précurseurs neuronaux au sein de la zone sous-ventriculaire (Bolteus and Bordey, 2004). Notons que chez le rat, c'est le GABA

qui joue un rôle chimio-attractif dans la migration des neurones embryonnaires (Behar et al., 1996; Behar et al., 1998; Behar et al., 2000). Le rôle des récepteurs GABA_A dans la migration neuronale a aussi été examiné au sein du cortex pariétal du rat nouveau né *in vivo* et *in vitro*. La transmission GABA via ces récepteurs GABA_A, régule la migration neuronale puisque son inhibition, par des agents pharmacologiques, induit des amas de cellules hétérotopiques au sein des couches les plus superficielles (Heck et al., 2007). Le blocage des récepteurs GABA_A augmente la vitesse de migration, suggérant une action inhibitrice du GABA dans la migration (Heck et al., 2007; Behar et al., 2000).

Deux études récentes ont montré que la migration des interneurones corticaux chez la souris dépendait de la polarité (dépolarisant/hyperpolarisant) du GABA (Bortone and Polleux, 2009; Miyoshi and Fishell, 2010). En effet, Bortone et Polleux ont montré que l'augmentation de la densité des co-transporteurs du chlore KCC2 extrudant le chlore des neurones, est nécessaire et suffisante pour réduire la mobilité des interneurones, à travers sa capacité à réduire la dépolarisation membranaire induite par l'activation des récepteurs GABA_A, causant ainsi une diminution de la fréquence des événements calcium intracellulaires spontanés (Bortone and Polleux, 2009). Ainsi l'augmentation de la densité de KCC2, en partie à l'origine de la fin de l'action dépolarisante du GABA (Ludwig et al., 2003; Rivera et al., 2004), marquerait la fin de la migration des interneurones corticaux (Bortone and Polleux, 2009; Miyoshi and Fishell, 2010).

Voigt et collaborateurs ont montré que le blocage des récepteurs glutamatergiques et GABAergiques qui transmettent l'activité développementale au sein des cultures de cellules dissociées de cortex cérébral de rat, augmentait la part de neurones en migration (de Lima et al., 2009). Ces auteurs suggèrent que l'initiation de l'activité spontanée du développement marque la fin de la migration neuronale. Au niveau du cervelet chez la souris, la migration radiale des cellules granulaires dépend de l'activation des canaux calcium de type N et des récepteurs NMDA, qui génèrent un flux de calcium intracellulaire positivement corrélé à leur vitesse de migration (Komuro and Rakic, 1996). Au niveau de l'hippocampe chez la souris, il a été proposé que la libération spontanée de GABA et de glutamate indépendante de l'exocytose vésiculaire conventionnelle, appelée libération paracrine, favoriserait la migration des cellules pyramidales embryonnaires (Demarque et al., 2002; Manent et al., 2005).

Ainsi, comme dans le cas de la prolifération neuronale, l'action positive ou négative des neurotransmetteurs dans la migration semble varier en fonction de la structure cérébrale

et/ou de l'espèce animale étudiées. Néanmoins, ces études suggèrent que ces neurotransmetteurs ont, une fois encore, un rôle de modulateur au cours d'un grand processus développemental, ici au cours de la migration neuronale.

IV.3. Le rôle de l'activité dans le guidage axonal

Hanson et Landmesser ont montré que le guidage des axones moteurs était particulièrement sensible aux patrons précis des épisodes d'activité spontanée chez l'embryon de poulet (Hanson and Landmesser, 2004; Hanson et al., 2008). En effet, la diminution de la fréquence des bouffées de décharges électriques de l'activité spontanée, via l'injection de picrotoxine, un antagoniste des récepteurs GABA_A, entraîne des erreurs de guidage axonal concernant le choix de la voie dorsale ou ventrale des motoneurones lombaires au sein des nerfs spinaux, lorsqu'ils convergent dans le plexus à la base des bourgeons de membres, ainsi qu'une régulation négative de plusieurs molécules nécessaires pour exécuter ces décisions de guidage (Hanson and Landmesser, 2004). Au contraire, l'augmentation de la fréquence des bouffées d'activité électrique, via l'injection de sarcosine qui empêche la recapture de la glycine endogène en bloquant le transporteur à la glycine GlyT1, n'affecte pas ce guidage dorso-ventral mais empêche l'étape suivante, correspondant à la fasciculation des axones en population spécifique (pool) pour innérer le muscle approprié (Hanson and Landmesser, 2006). Ainsi ces études montrent que le guidage axonal des motoneurones est dépendant du patron de l'activité électrique spontanée de la moelle épinière. De plus il a été montré que l'incidence, la fréquence et l'amplitude des événements calciques spontanés des neurones corticaux en développement, sont inversement corrélés à la vitesse de croissance axonale (Gu and Spitzer, 1995; Tang et al., 2003). La croissance axonale peut être inhibée par les événements calciques spontanés exprimés directement au niveau des cônes de croissance (Gomez et al., 1995; Gomez and Spitzer, 1999; Tang et al., 2003).

De même, la sélection de la cible corticale des axones du thalamus semble activité-dépendante au cours du développement. Au cours de la période du développement embryonnaire où les vagues rétinienques spontanées sont exprimées et transmises au thalamus, les axones des corps genouillés latéraux du thalamus sont en route vers le cortex visuel. Le blocage des potentiels d'action par l'injection intra-cérébrale de TTX chez le chat, altère le patron des projections thalamo-corticales (Catalano and Shatz, 1998)

IV.4. Le rôle de l'activité dans la croissance neuritique

Un niveau physiologique d'activité au sein des cellules ganglionnaires de la rétine en développement stimule la croissance axonale via l'action de facteurs trophiques peptidiques (Goldberg et al., 2002). Inversement, en cas d'absence d'activité, les facteurs trophiques stimulent peu la croissance axonale des cellules ganglionnaires de la rétine (Goldberg et al., 2002). De plus, le lien moléculaire direct liant l'activité spontanée de la rétine aux mécanismes de guidage axonal participant à la mise en place des cartes rétinotopiques a été récemment mis en évidence (Nicol et al., 2007).

En effet, ces auteurs ont montré que la dépolarisation neuronale agissait en synergie avec le signal répulsif de la molécule Ephrin, qui permet la rétraction des cônes de croissance, via l'activation de l'AMP cyclique et de seconds messagers calciques (Nicol et al., 2007). Plusieurs études ayant examiné le système visuel immature, ont montré que l'activité du développement jouait un rôle dans la mise en place de l'arborisation dendritique. En effet, le blocage des récepteurs NMDA au sein des neurones du *tectum optique* du têtard de Xénope, pendant la période de synaptogenèse lors de laquelle les cônes de croissance libèrent des neurotransmetteurs, supprime le développement des arbres dendritiques des neurones du *tectum* en abolissant l'addition de nouvelles branches et l'extension des branches préexistantes (Rajan and Cline, 1998). De même, chez l'embryon de poulet, la transmission cholinergique entraîne localement une libération de calcium qui stabilise les dendrites en développement des cellules ganglionnaires de la rétine (Lohmann et al., 2002). Au cours du stade de développement rétinien suivant, le blocage de la transmission glutamatergique supprime la mobilité des dendrites (Wong et al., 2000). L'activité spontanée de la rétine semble aussi favoriser la ségrégation des dendrites des cellules ganglionnaires ON et OFF au sein de la rétine. D'autres auteurs ont rapporté l'implication de la transmission glutamatergique métabotropique dans ce processus (Bisti et al., 1998; Bodnarenko and Chalupa, 1993). Feller et collaborateurs ont montré que les vagues rétiennes dépendantes de la transmission cholinergique sont aussi impliquées, mais ne sont pas nécessaires, dans cette ségrégation dendritique (Bansal et al., 2000). Ainsi, les stades successifs de vagues rétiennes jouent un rôle plus ou moins direct dans le développement dendritique et axonal des cellules ganglionnaires de la rétine.

Un grand nombre d'études a montré le rôle du GABA dans la croissance des neurites au sein de régions cérébrales et d'espèces variées (pour revue: Sernagor et al., 2010). Au niveau cortical, plusieurs études ont montré que le GABA exerçait une influence morphogène au

cours du développement des neurones néocorticaux, en particulier via l'activation des canaux calciques de type L (Baloyannis et al., 1983; Ben Ari et al., 1994; Spoerri, 1988; Barbin et al., 1993; Maric et al., 2001; Marty et al., 1996; Ageta-Ishihara et al., 2009). Par exemple, la croissance neuritique des interneurones GABAergiques de la plaque corticale est favorisée par l'activation d'autorécepteurs de type GABA_A et de canaux calciques de type L (Barbin et al., 1993; Maric et al., 2001; Marty et al., 1996). Concernant les cellules pyramidales, la transfection *in utero* de KCC2, rendant l'action du GABA hyperpolarisante de façon précoce chez les progéniteurs de neurones glutamatergiques corticaux entraîne un défaut de croissance neuritique de ces neurones (Cancedda et al., 2007). De façon similaire, un défaut d'expression de NKCC1, transporteur responsable de l'entrée de chlore dans les neurones et donc de l'action dépolarisante du GABA, entraîne également un défaut de croissance dendritique et de développement des synapses glutamatergiques conduisant à des déficits sensori-moteurs (Wang and Kriegstein, 2008). Une étude récente a examiné si la transmission GABAergique pouvait affecter la maturation de la morphologie axonale des cellules pyramidales à la fois *in vitro* et *in vivo* (Ageta-Ishihara et al., 2009). Cette étude a montré que l'augmentation de calcium intracellulaire induite par la transmission GABAergique dépolarisante active en cascade des protéines spécifiques, les protéines kinases calcium-calmoduline dépendantes, qui vont favoriser l'élongation des projections axoniques callosales (Ageta-Ishihara et al., 2009). Une autre étude récente a montré qu'un certain niveau d'activité à la fois pré-synaptique et post-synaptique était nécessaire pour le développement des projections axoniques callosales. En effet, la surexpression de canaux potassiques Kir2.1 au niveau des neurones pré- et/ou post-synaptiques, engendrant un faible niveau d'excitabilité électrique au niveau de ces neurones, entraîne une altération de la croissance des projections axoniques callosales et de l'élaboration de son arborisation (Mizuno et al., 2010).

De même, au niveau de l'hippocampe, le GABA semble favoriser la croissance et l'arborisation des neurites par une action tonique sur leur récepteur GABA_A (Barbin et al., 1993; Giusi et al., 2009).

IV.5. Le rôle de l'activité dans la spécification des neurotransmetteurs et de leurs récepteurs
La spécification des neurotransmetteurs est déterminée par l'activité électrique précoce au sein d'un grand nombre de systèmes, en parallèle de l'expression de facteurs de transcription cellule-spécifiques (pour revue : Ben-Ari and Spitzer, 2010). Ainsi, il a été montré

récemment que le facteur de transcription activité-dépendant cJun régule la transcription du gène à homéoboite *tlx3* qui lui-même détermine la spécification du neurotransmetteur (glutamatergique versus GABAergique) des neurones de la moelle épinière dorsale chez le Xénope Tropicalis (Marek et al., 2010). Une altération de l'activité peut changer le nombre de neurones exprimant les transmetteurs excitateurs et inhibiteurs : la suppression de l'activité des neurones spinaux du xénope embryonnaire augmente l'incidence de l'expression des transmetteurs excitateurs et diminue celle des transmetteurs inhibiteurs (Borodinsky et al., 2004). Au contraire, l'augmentation de leur activité diminue l'incidence des transmetteurs excitateurs et augmente celle des transmetteurs inhibiteurs (Borodinsky et al., 2004). Aussi, il a été montré que les cellules musculaires embryonnaires du xénope expriment, en plus des récepteurs à l'acétylcholine, différentes populations de récepteurs telles que les récepteurs au glutamate, au GABA et à la glycine. Lors de la différentiation et de l'innervation normale du muscle, les autres types de récepteurs disparaissent. Le changement de l'expression des transmetteurs par l'altération de l'activité calcique engendre une rétention des classes de récepteurs apparentés à ces transmetteurs, c'est-à-dire, les récepteurs non-cholinergiques (Borodinsky and Spitzer, 2007). Ces résultats suggèrent que l'activité neuronale précoce dans la moelle épinière assurerait la correspondance des transmetteurs et de leurs récepteurs et régulerait l'identité des synapses qui se forment.

IV.6. Le rôle de l'activité dans la maturation synaptique

Plusieurs études ont montré que la transmission synaptique via les récepteurs NMDA régule le recrutement synaptique des récepteurs AMPA (Brill and Huguenard, 2008; Feldmeyer and Cull-Candy, 1996; Radnikow et al., 2002; Shi et al., 2001; Voigt et al., 2005; Wang and Kriegstein, 2008; Zhu et al., 2000). Cependant, certaines de ces études suggèrent que l'action du NMDA consiste en une régulation négative du recrutement des récepteurs AMPA au sein des synapses (Hall and Ghosh, 2008), alors que d'autres proposent une régulation positive du recrutement des récepteurs AMPA par l'action du NMDA (Brill and Huguenard, 2008; Shi et al., 2001; Voigt et al., 2005; Zhu et al., 2000). Cette controverse est plus générale puisque d'autres études indiquent que la maturation de ces deux types de récepteurs pourrait être indépendante (Colonnese et al., 2003; Okabe et al., 1998; Zhu and Malinow, 2002). Notons qu'une étude plus récente a montré une action du GABA dans la maturation synaptique. Selon ces auteurs les courants synaptiques transmis par les récepteurs GABA_A et NMDA sont enregistrés avant les courants synaptiques transmis par les récepteurs AMPA et

contribueraient, ensemble, au développement de synapses fonctionnelles contenant les récepteurs AMPA (Wang and Kriegstein, 2008).

IV.7. Le rôle de l'activité dans l'expression des canaux ioniques voltage-dépendants

Au cours du développement musculaire des embryons d'ascidies, petits invertébrés marins, les courants calciques sont exprimés avant l'apparition des courants potassiques sortants à activation rapide et entrants rectifiant, engendrant une période d'activité spontanée. Lorsque les potentiels d'action calcium-dépendants sont bloqués, l'expression développementale des courants potassiques à activation rapide, est spécifiquement supprimée (Dallman et al., 1998). Au sein des neurones spinaux du Xénope embryonnaire, le courant rectifiant retardé joue un rôle central dans la conversion des potentiels d'action dépendants du calcium en potentiels d'action dépendants du sodium et les influx calciques à travers les canaux voltages-dépendants induisent une augmentation de la vitesse d'activation de ces canaux potassiques rectifiant retardés (Desarmenien and Spitzer, 1991;Gu and Spitzer, 1995).

Chez le rat, au sein du cervelet en développement, l'expression des canaux potassiques voltage-dépendants de type Kv3.1 est augmentée par la dépolarisation du réseau neuronal (Liu and Kaczmarek, 1998a). De même, au niveau du colliculus inférieur chez le rat, une dépolarisation et un influx de calcium au sein des neurones en développement peuvent augmenter sélectivement le niveau d'expression des canaux potassium de type Kv3.1 et ainsi augmenter l'excitabilité des neurones immatures (Liu and Kaczmarek, 1998b)

Au sein de l'hippocampe chez la souris, six membres de la famille des canaux Kv1 apparaissent au cours du développement postnatal et contribuent à l'augmentation de l'amplitude des courants sortants macroscopiques ; mais seulement Kv1.1, Kv1.2, et Kv1.4 semblent être dépendants de l'activité (Grosse et al., 2000). En effet, pour ces derniers, le blocage des potentiels d'action des neurones de l'hippocampe par l'utilisation de TTX, prévient l'apparition de ces canaux au niveau des cellules pyramidales en développement (Grosse et al., 2000).

L'expression des canaux sodium voltage-dépendants semble également être régulée par l'activité. En effet, au sein des neurones de l'hippocampe ou du cortex chez le rat, l'activité déclenchée par les activateurs des canaux sodium (les neurotoxines telles que la toxine de scorpion alpha et la veratridine) engendre une rapide internalisation des protéines canaux sodium et une diminution de l'expression des ARNm codant pour leur sous-unités alpha (Dargent and Couraud, 1990;Dargent et al., 1994;Giraud et al., 1998;Lara et al., 1996;Paillart

et al., 1996). Ce phénomène est spécifique du développement (Dargent and Couraud, 1990) et des canaux sodium (Paillart et al., 1996). Au contraire, les neurones corticaux immatures montrent une augmentation de leur expression lorsque l'activité de réseau est bloquée par l'utilisation de TTX (Desai et al., 1999).

Ces résultats suggèrent que l'activité électrique spontanée peut réguler le niveau d'excitabilité des cellules en contrôlant l'expression des canaux qui la génèrent.

IV.8. Le rôle de l'activité dans le développement de centres générateurs de rythme

Afin de déterminer si le premier patron d'activité neuronale de la moelle épinière, dépendant de l'acétylcholine, est nécessaire pour à la mise en place du centre génératrice de rythme (CPG), Pfaff et collaborateurs ont étudié des souris mutantes pour l'enzyme de synthèse de l'Ach (Myers et al., 2005). Ils montrent que le circuit spinal présente une activité rythmique chez ces souris dont la période est allongée et dont les coordinations droite-gauche, *i.e.* les coordinations des contractions des groupes de muscles de chaque côté du corps, sont anormales, ainsi que les coordinations des contractions des muscles flexeur-extenseurs. Au contraire, le blocage des récepteurs acétylcholinergiques après que le CPG soit établi, n'affecte pas les coordinations droites-gauches et flexeur-extenseurs (Myers et al., 2005). Cette étude suggère que l'activité spontanée dépendante de la transmission cholinergique de la moelle épinière joue un rôle dans la configuration du réseau locomoteur au cours d'une période transitoire du développement.

IV.9. Le rôle de l'activité dans l'affinement des cartes sensorielles

Chez les mammifères, l'affinement des projections rétino-colliculaires et rétino-géniculaires, respectivement en carte rétinotopique et en couches alternées spécifiques de chaque œil, a lieu avant le début des expériences visuelles. Cependant, au cours de cette période, les vagues rétinienques, principalement les vagues du stade II chez la souris, parcoururent la rétine en développement et semblent être primordiales dans l'affinement de ces cartes. En effet, le blocage de toute activité rétinienne, par l'injection intraoculaire de TTX altère la distribution spatiale des cellules ganglionnaires de la rétine marquées par injections locales de traceurs rétrogrades au sein du colliculus supérieur (O'Leary et al., 1986). De même, les axones des cellules ganglionnaires ne se séparent pas pour former les couches oculaires alternées lorsque leurs potentiels d'action ont été inhibés par l'injection de TTX au niveau du chiasma optique (Sretavan et al., 1988) ou lorsque les vagues rétinienques de type II transmises par

l'acétylcholine, sont bloquées par l'injection binoculaire d'un agent pharmacologique (principalement l'epibatidine, un puissant agoniste qui lie les récepteurs acétylcholinergiques nicotiniques des cellules ganglionnaires adultes avec une très grande affinité (Badio and Daly, 1994;Kittila and Massey, 1997) et bloque les augmentations périodiques de concentration de calcium intracellulaire lorsqu'il est utilisé à 1 nM via la désensibilisation du récepteur, cet agoniste permet de bloquer efficacement l'activité des cellules ganglionnaires *in vivo* (Huberman et al., 2002;Penn et al., 1998;Rossi et al., 2001) ou par l'utilisation de souris knock-out pour la sous unité $\beta 2$ du récepteur à l'acétylcholine (Muir-Robinson et al., 2002;Rossi et al., 2001). De plus, l'utilisation de ces souris mutantes qui n'expriment pas les vagues de type II, a permis de mettre en évidence un affinement irrégulier des cartes rétinotopiques (Chandrasekaran et al., 2005;McLaughlin et al., 2003). Ainsi ces études suggèrent que les vagues rétiniennes jouent un rôle dans la mise en place des connexions précises entre les cellules de la rétine et celles du colliculus supérieur ainsi qu'entre les cellules de la rétine et celle des corps genouillés latéraux du thalamus, afin de former les cartes sensorielles rétinotopiques et les couches oculaires alternées.

Cependant, on peut se demander si c'est réellement le patron spécifique de l'activité neuronale corrélée du développement ou simplement le niveau global d'excitabilité des neurones du réseau qui permet de remplir les fonctions évoquées ci-dessus. Les approches expérimentales les plus utilisées pour tester cette hypothèse sont l'utilisation de toxines ou de souris mutantes pour une protéine spécifique, dont le résultat sera la dégradation du patron d'activité neuronale corrélée normalement exprimé à un stade donné mais le maintien d'un niveau global d'activité des neurones individuels du réseau. Si de telles manipulations n'altèrent pas la fonction étudiée, ces études concluent que seul le niveau global d'excitabilité importe ; à l'inverse, si ces manipulations altèrent la fonction, les études concluent que le patron spécifique d'activité neuronale corrélée permet la fonction étudiée. Considérons par exemple la fonction d'affinement des cartes rétinotopiques et des couches oculaires alternées par les vagues rétiniennes. Comme nous l'avons mentionné plus haut, l'absence des vagues rétiniennes chez les souris knock-out pour la sous unité $\beta 2$ du récepteur à l'acétylcholine est corrélée à un affinement irrégulier des cartes rétinotopiques malgré la présence d'un niveau d'activité quasi normal (Chandrasekaran et al., 2005;McLaughlin et al., 2003). Dans ce cas il semble que ce soit le patron des vagues rétiniennes, permettant l'activité corrélée des cellules ganglionnaires, qui importe pour affiner les cartes rétinotopiques. De même, chez ces souris mutantes les axones rétino-

geniculés ne se séparent pas en couches oculaires alternées (Muir-Robinson et al., 2002; Rossi et al., 2001) suggérant que les vagues rétiniennes de type II sont également importantes pour la ségrégation en couches du corps genouillé du thalamus. Cependant, Huberman et ses collaborateurs ont utilisé une immuno-toxine (un anticorps dirigé contre le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine conjugué à la saporine (VACHT-SAP)) qui engendre la réduction des corrélations entre les potentiels d'action des paires de cellules ganglionnaires voisines alors que le niveau global d'activité reste similaire aux rétines contrôles (Huberman et al., 2003). Les projections rétino-géniculaires des animaux traités avec cette toxine sont normales et permettent d'obtenir une ségrégation en couches oculaires alternées similaire à celle des animaux contrôles (Huberman et al., 2003). Dans ce cas le patron d'activité neuronale ne semble pas primordial pour cette fonction. De même Feller et ses collaborateurs ont montré que l'interruption du patron d'activité neuronale du développement chez les souris Cx36/- pour lesquelles les cellules ganglionnaires rétiniennes émettent des potentiels d'actions asynchrones, n'entraîne pas de défaut de mise en place des couches oculaires alternées (Hansen et al., 2005). Une explication possible pour ces résultats opposés est proposée dans la partie discussion du manuscrit.

Une étude récente a également tenté de dissocier l'importance du patron d'activité neuronale de celle d'un niveau global d'activité sans patron spécifique, pour un autre processus : l'intégration de neurones nouvellement formés au sein de circuits matures (Lin et al., 2010). Les auteurs ont modifié génétiquement les propriétés électriques intrinsèques des neurones du bulbe olfactif générés au stade adulte par l'incorporation de vecteurs rétroviraux des canaux ioniques potassiques ou sodiques au sein des progéniteurs neuronaux et montré que ces modifications n'affectent pas la formation de leurs synapses. Ils concluent que le patron de décharge précis de ces neurones n'est pas essentiel pour leur intégration au sein des circuits neuronaux.

De même, bien qu'à notre connaissance il n'y ait aucune preuve directe, plusieurs groupes suggèrent que l'activité spontanée au sein des fibres du nerf auditif qui est exprimée avant le début des expériences auditives, joue un rôle dans l'affinement des cartes tonotopiques au sein des noyaux auditifs (Forsythe, 2007; Gabriele et al., 2000; Kandler, 2004; Kandler et al., 2009; Leake et al., 2006; Rubel and Fritzsch, 2002; Tritsch et al., 2007).

IV.10 Le rôle de l'activité dans l'apoptose ou la survie neuronale

Le rôle de l'activité spontanée dans la survie neuronale a été abondamment décrite au sein du système auditif (Rubel and Fritzsch, 2002). Par exemple, une étude a montré une mort neuronale rapide au sein du noyau cochléaire du tronc cérébral en cas d'ablation de la cochlée ou lorsque la VIII^{ième} paire de nerfs crâniens, qui établit des connexions synaptiques au niveau de ce noyau cochléaire et qui est normalement activée lors de l'activité spontanée des cellules ciliées de la cochlée, est inhibée (Mostafapour et al., 2000). Notons que cette mort neuronale implique l'activation de l'apoptose (Mostafapour et al., 2002).

L'effet de l'activité synchrone dans la survie neuronale a été étudié au sein de cultures de neurones corticaux dans lesquelles le TTX réduit la survie neuronale alors que les dépolarisations induites par le KCl l'augmentent. De plus, les neurones qui survivent sélectivement sont ceux qui sont actifs de façon synchrone avec d'autres neurones (Voigt et al., 1997). La survie activité-dépendante des neurones corticaux nécessite un influx calcique via les canaux calcium voltage-dépendants et/ou via les récepteurs NMDA (Ghosh et al., 1994; Ono et al., 2003).

Le blocage des récepteurs NMDA au cours de la fin de la vie fœtale ou au début de la vie néonatale déclenche une neurodégénération apoptotique généralisée au sein du cerveau de rat en développement, suggérant que la transmission glutamatergique via les récepteurs NMDA, contrôle également la survie neuronale (Ikonomidou et al., 1999). Plus récemment, un groupe a montré que le NMDA induisait un effet différentiel en fonction de la profondeur des couches et donc de l'âge des neurones : le NMDA induit une excitotoxicité au sein des couches corticales profondes, par l'induction du gène pro-apoptotique Bax qui altère l'intégrité mitochondriale, mais un fort effet anti-apoptotique au sein des couches superficielles plus immatures lors du développement cortical chez la souris (Desfeux et al., 2010).

Ainsi, l'ensemble de ces études illustre comment les systèmes de neurotransmission et/ou l'activité calcique intracellulaire régulent chacune des grandes étapes développementales du système nerveux. Or nous avons vu précédemment (partie III de l'introduction) que les activités spontanées du développement impliquaient également les systèmes de neurotransmission et/ou des variations de calcium intracellulaire. Il est donc possible que ces activités spontanées du développement soient la source des phénomènes décrits ci-dessus.

Résultats

Article I

Sequential Generation of Two Distinct Synapse-Driven Network Patterns in Developing Neocortex

Camille Allene, Adriano Cattani, James B. Ackman, Paolo Bonifazi, Laurent Aniksztejn,
Yehezkel Ben-Ari, and Rosa Cossart

Problématique :

Les SPAs (Synchronous Plateau Assemblies) ont été décrit dans l'hippocampe comme le premier patron d'activité neuronale coordonnée qui émerge à la naissance et synchronise par jonctions GAP des assemblées de neurones restreintes produisant des plateaux calciques, indépendamment de la transmission synaptique (Crepel et al., 2007). Leur déclin à la fin de la première semaine postnatale coïncide avec l'apparition des GDPs (« Giant Depolarizing Potentials ») qui synchronisent un grand nombre de neurones par transmission synaptique, principalement grâce à la transmission GABAergique, dépolarisante à ce stade du développement (Ben Ari et al., 1989; Crepel et al., 2007; Garaschuk et al., 1998).

Le premier objectif de cette étude était de tester l'existence de SPAs au sein du néocortex. En effet, il était important de comprendre si les SPAs étaient un type d'activité spécifique de l'hippocampe ou s'ils présentaient au contraire un caractère universel en s'exprimant au cours du développement dans d'autres structures cérébrales. Le second objectif était de décrire la mise en place de l'activité neuronale corrélée dans le néocortex au cours des premiers jours suivant la naissance.

Nous avons montré au cours de ce travail que les SPAs existent dans le néocortex et présentent des propriétés similaires à celles des SPAs de l'hippocampe telles que de larges plateaux calcium qui correspondent à des oscillations récurrentes du potentiel membranaire en enregistrement courant imposé au potentiel de repos de la cellule. Comme au niveau de l'hippocampe, les SPAs ne sont pas affectés par le blocage de la transmission synaptique mais sont altérés par les antagonistes des canaux sodium et calcium de type L. Finalement, les SPAs des deux structures cérébrales sont contrôlées par des signaux moléculaires impliqués lors de la naissance puisque l'oxytocine, l'hormone libérée au moment de l'accouchement, augmente la proportion de neurones SPAs dans le réseau.

Nous avons également décrit la mise en place des différents patrons d'activité neuronale corrélée exprimés au sein du néocortex périnatal. Au cours des premiers jours suivant la naissance, le réseau peut exprimer en parallèle des SPAs, les ENOs pour « Early Network Oscillations » bien décrites précédemment par le groupe de Konnerth et collaborateurs (Adelsberger et al., 2005; Garaschuk et al., 2000). En accord avec les résultats de ces études, nous avons montré que les ENOs sont des oscillations calciques à grande échelle survenant immédiatement après la naissance, à basse fréquence (~ 0.01 Hz) et dépendante de la transmission glutamatergique via les récepteurs NMDA. A la fin de la première semaine postnatale les GDPs, décrits ici pour la première fois au sein du néocortex, apparaissent et

marquent la fin des SPAs et des ENOs. Se basant sur les similarités apparentes de ces patrons d'activité neuronale, les ENOs du néocortex étaient précédemment considérées comme les homologues néocorticaux des GDPs de l'hippocampe. Ici nous montrons que les ENOs et les GDPs sont en fait deux patrons d'activité neuronale bien distincts dans le néocortex, caractérisés par des mécanismes et des dynamiques spatio-temporelles différentes. Par ailleurs nous avons enregistré le corrélat électrophysiologique cellulaire des événements correspondants aux ENOs, jusqu'ici enregistrées seulement en imagerie calcium. Ces vagues calciques correspondent en mode courant imposé, à des dépolarisations du potentiel membranaire de cinétique lente et de longue durée (~2.5 s). Enfin nous avons montré que les ENOs sont préférentiellement observées dans des conditions d'anoxie modérée et dépendent de la concentration extracellulaire du glutamate, suggérant une sensibilité critique du néocortex en développement face aux accumulations pathologiques de certains neurotransmetteurs. Cette dernière observation pose la question de la pertinence physiologique des ENOs. Notons que cet aspect est discuté dans la première partie de la discussion générale et dans l'article de revue (Allene and Cossart, 2009).

Sequential Generation of Two Distinct Synapse-Driven Network Patterns in Developing Neocortex

Camille Allène, Adriano Cattani, James B. Ackman, Paolo Bonifazi, Laurent Aniksztejn, Yehezkel Ben-Ari, and Rosa Cossart

Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Inserm U901, Université de la Méditerranée, 13273 Marseille cedex 9, France

Developing cortical networks generate a variety of coherent activity patterns that participate in circuit refinement. Early network oscillations (ENOs) are the dominant network pattern in the rodent neocortex for a short period after birth. These large-scale calcium waves were shown to be largely driven by glutamatergic synapses albeit GABA is a major excitatory neurotransmitter in the cortex at such early stages, mediating synapse-driven giant depolarizing potentials (GDPS) in the hippocampus. Using functional multineuron calcium imaging together with single-cell and field potential recordings to clarify distinct network dynamics in rat cortical slices, we now report that the developing somatosensory cortex generates first ENOs then GDPS, both patterns coexisting for a restricted time period. These patterns markedly differ by their developmental profile, dynamics, and mechanisms: ENOs are generated before cortical GDPS (cGDPS) by the activation of glutamatergic synapses mostly through NMDARs; cENOs are low-frequency oscillations (~ 0.01 Hz) displaying slow kinetics and gradually involving the entire network. At the end of the first postnatal week, GABA-driven cortical GDPS can be reliably monitored; cGDPS are recurrent oscillations (~ 0.1 Hz) that repetitively synchronize localized neuronal assemblies. Contrary to cGDPS, cENOs were unexpectedly facilitated by short anoxic conditions suggesting a contribution of glutamate accumulation to their generation. In keeping with this, alterations of extracellular glutamate levels significantly affected cENOs, which are blocked by an enzymatic glutamate scavenger. Moreover, we show that a tonic glutamate current contributes to the neuronal membrane excitability when cENOs dominate network patterns. Therefore, cENOs and cGDPS are two separate aspects of neocortical network maturation that may be differentially engaged in physiological and pathological processes.

Key words: development; GABA; imaging; network; cortex; synchrony

Introduction

Spontaneous correlated neuronal activity is the hallmark of developing networks and plays a central role in their construction (Katz and Shatz, 1996; Khazipov et al., 2004; Cang et al., 2005; Kandler and Gillespie, 2005; Nicol et al., 2007). A variety of coordinated activity patterns have been described in developing neocortical structures from correlated pairs of neuronal precursor cells (Owens and Kriegstein, 1998) to gap junction-synchronized cortical columns (Yuste et al., 1992; Kandler and Katz, 1998; Dupont et al., 2006). Clarifying the underlying mechanisms and the spatiotemporal interactions between these diverse network patterns is crucial toward understanding their ultimate function in the construction of cortical maps.

Two synapse-driven network patterns have been extensively described in immature cortical structures: (1) Cortical early net-

work oscillations (cENOs) are large-scale oscillatory calcium waves, occurring immediately after birth at low frequency and providing most of the coherent activity in the developing rodent neocortex (Garaschuk et al., 2000). Cortical ENOs require action potentials and are driven by NMDA and AMPA receptors but not GABA_A receptors (Garaschuk et al., 2000; Corlew et al., 2004; McCabe et al., 2006). (2) Giant depolarizing potentials (GDPS) are the earliest synapse-driven network pattern in the developing hippocampus (Ben-Ari et al., 1989; Garaschuk et al., 1998; Crépel et al., 2007). They occur a few days after birth in rodents at moderate frequency (~ 0.1 Hz). They are driven by GABAergic transmission and disappear with the excitatory/inhibitory shift in the actions of GABA (Ben-Ari et al., 1989; Garaschuk et al., 1998; Tyzio et al., 2007).

Relying on the apparent similarities between these patterns, it was concluded that cENOs were the cortical counterpart to the hippocampal GDPS but generated by glutamatergic synapses, which would play a more critical role in the developing neocortex ("cortical GDPS") (McCabe et al., 2007). Therefore GDPS and cENOs would reflect intrinsic differences between brain structures. Yet, GABA also excites immature neocortical neurons (Yuste and Katz, 1991; Owens et al., 1996; Dammerman et al., 2000; Garaschuk et al., 2000; Marandi et al., 2002; Yamada et al., 2004; Tyzio et al., 2006; Ben-Ari et al., 2007) and the possibility that cENOs and GDPS could be separate network patterns se-

Received July 31, 2008; revised Sept. 30, 2008; accepted Oct. 5, 2008.

This work was supported by grants from Inserm, the Ville de Marseille and Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, and the Agence Nationale Recherche (Programme Jeunes Chercheurs). R.C. is funded by the Centre National de la Recherche Scientifique. C.A. is funded by the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche. P.B. is funded by the Marie Curie Fellowship. We thank Sonja Martin for her contribution to the supplemental movies and Dr. Milh for helpful discussions.

Correspondence should be addressed to Dr. Rosa Cossart, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Inserm U29, Parc Scientifique de Luminy, BP.13, 13273 Marseille cedex 9, France. E-mail: cossart@inmed.univ-mrs.fr.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.3733-08.2008

Copyright © 2008 Society for Neuroscience 0270-6474/08/2812851-13\$15.00/0

quentially dominating the developing neocortex has not been excluded.

To test this hypothesis we monitored the spatiotemporal patterns of neuronal activities in slices of rat somatosensory cortex between embryonic to postnatal stages using multibeam two-photon microscopy, on-line analysis, and targeted single-cell and field potential recordings. We show that the immature neocortex produces at birth cENOs and cortical synchronous plateau assemblies [cSPAs, i.e., synchronous calcium plateaus associated with intrinsic membrane potential oscillations in restricted groups of neurons, identical to the recently described activity in the hippocampus (Crépel et al., 2007)], then GABA-driven GDPs that are similar to hippocampal GDPs. These patterns differed in their spatiotemporal dynamics, intracellular correlates, developmental profile, and pharmacological features. Indeed, cENOs were generated by the activation of NMDARs and favored by higher extracellular glutamate levels in contrast to cGDPs which preferentially involved GABAergic transmission. Remarkably, a tonic glutamate current excited neurons at the stage when cENOs were preferentially observed. Finally, we show that cENOs and cGDPs present a differential sensitivity to anoxic conditions since the occurrence of cGDPs was impaired while cENOs were transiently increased, in anoxic/aglycemic or low rate saline perfusion. We conclude that the neocortex successively generates two coherent activity patterns, first cENOs then cGDPs. This developmental sequence results in differential sensitivity to ischemia during maturation.

Materials and Methods

Slice preparation and calcium imaging. Coronal and horizontal slices of somatosensory cortex (400–450 μm thick) were prepared from E20 to 9-d-old (P9) Wistar rats using a Microm tissue slicer (International) in ice-cold oxygenated modified artificial CSF (mACSF: 0.5 mM CaCl_2 and 7 mM MgSO_4 ; NaCl replaced by an equimolar concentration of choline). Most of the experiments were performed on horizontal slices since the incidence of calcium waves (cENOs) was critically diminished in coronal slices (see Table 1) (Garaschuk et al., 2000; Corlew et al., 2004; Sun and Luhmann, 2007). Slices were then transferred for rest (~ 1 h) in oxygenated normal ACSF containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , 1.3 MgCl_2 , 2.0 CaCl_2 , and 10 D-glucose, pH 7.4. For AM-loading, slices were incubated in a small vial containing 2.5 ml of oxygenated ACSF with 25 μl of a 1 mM fura-2 AM solution (Molecular Probes; in 100% DMSO) for 20–30 min. Slices were incubated in the dark, and the incubation solution was maintained at 35–37°C. The fraction of labeled cells was constant for all age groups included in the study (at P1: $6 \pm 3\%$ cells were visible in transmitted light but not in the calcium fluorescence image, $n = 1391$ cells, vs $5 \pm 1\%$ at P8, $n = 888$ cells, $p = 0.9$). Unless indicated otherwise, slices were perfused at a rate of 4 ml/min with continuously aerated (95% O_2 /5% CO_2) normal ACSF at 35–37°C. Imaging was performed with a

Table 1. Quantitative comparison between cENOs and cGDPs in cortical slices

	cENO	cGDP
Age		
E20		
Incidence	0/11	0/11
P0–P4		
Amp	38 ± 3 ($n = 53$)	
Freq (per min)	2.45 ± 0.3 ($n = 53$)	
Incidence	53/110	1/3
P5–P9		
Amp	41 ± 13 ($n = 3$)*	13 ± 3 ($n = 63$)
Freq (per min)	3.25 ± 2.26 ($n = 3$)*	8.4 ± 0.7 ($n = 63$)
Incidence	3/48	63/137
Orientation of slices		
Coronal		
Amp	47 ± 29 ($n = 2$)*	7 ± 1 ($n = 12$)
Freq (per min)	n.a.	6.81 ± 1.07 ($n = 12$)
Incidence	2/42	12/27
Horizontal		
Amp	39 ± 3 ($n = 56$)*	16 ± 1 ($n = 64$)
Freq (per min)	2.55 ± 0.34 ($n = 56$)*	9.2 ± 0.8 ($n = 64$)
Incidence	56/158	64/140
Pharmacology		
Bicuculline		
Amp (% cont)	111 ± 25 ($n = 9$)*	9 ± 7 ($n = 9$)
Freq (% cont)	153 ± 72 ($n = 9$)*	0 ($n = 9$)
D-APV		
Amp (% cont)	13 ± 6 ($n = 13$)*	54 ± 21 ($n = 5$)
Freq (% cont)	22 ± 1 ($n = 13$)*	70 ± 5 ($n = 5$)
D-APV + NBQX		
Amp/cont (%)	7 ± 7 ($n = 14$)*	80 ± 17 ($n = 6$)
Freq/cont (%)	5 ± 1 ($n = 14$)*	14 ± 14 ($n = 6$)
Calcium events kinetics		
Rise time (s)	1.02 ± 0.02 ($n = 1000$)*	0.230 ± 0.005 ($n = 1000$)
Decay (s)	5.32 ± 0.2 ($n = 1000$)*	1.02 ± 0.2 ($n = 1000$)
Synchronicity duration (s)	0.97 ± 0.11 ($n = 1000$)*	0.25 ± 0.05 ($n = 1000$)
Patch-clamp recordings		
Amplitude (mV)	12.8 ± 2.5 ($n = 9$)	12.4 ± 4.4 ($n = 4$)
Duration (s)	2.4 ± 0.8 ($n = 9$)*	0.28 ± 0.0 ($n = 4$)
Rise time (s)	0.6 ± 0.2 ($n = 9$)*	0.05 ± 0.0 ($n = 4$)
AP number	3.5 ± 1.5 ($n = 9$)	4.2 ± 0.0 ($n = 4$)
Firing frequency (Hz)	1.9 ± 0.5 ($n = 9$)*	15.4 ± 0.5 ($n = 4$)
Frequency (per min)	1.6 ± 0.5 ($n = 9$)*	8.2 ± 0.8 ($n = 4$)
Field potential recordings		
Amplitude (μV)	142 ± 58 ($n = 5$)	43 ± 9 ($n = 7$)
Duration (s)	2.7 ± 0.3 ($n = 5$)*	0.5 ± 0.4 ($n = 7$)
Peak frequency (Hz)	15.3 ± 3.9 ($n = 5$)	n.a.
Rate of occurrence (Hz)	0.010 ± 0.007 ($n = 5$)*	0.15 ± 0.03 ($n = 7$)
MUA (Hz)	28.6 ± 7.8 ($n = 5$)	14.6 ± 2.5 ($n = 7$)

Amp, Amplitude; AP, action potential; Freq, frequency; n.a., not applicable. See Materials and Methods. Bicuculline, 10 μM ; D-APV, 40 μM ; NBQX, 10 μM . * $p < 0.05$ compared with cGDPs.

multibeam two-photon laser scanning system (Trimscope-LaVision Biotech) coupled to an Olympus microscope as previously described (Crépel et al., 2007). Images were acquired through a CCD camera (La Vision Imager 3QE), which typically resulted in a time resolution of ~ 100 ms (2×2 binning, pixel size: 600 nm). Slices were imaged using a low-magnification, high-numerical-aperture objective ($20\times$, NA 0.95, Olympus). The size of the imaged field was typically $430 \times 380 \mu\text{m}^2$. Imaging depth was on average 80 μm below the surface (range: 50–100 μm).

Analysis. As previously described (Crépel et al., 2007), analysis of the calcium activity was performed with custom-made software written in Matlab (MathWorks). This program aimed at the automatic identification of loaded cells and at measuring their fluorescence as a function of time. The calcium signal of each cell was the average fluorescence within the contour of that cell, measured as a function of time.

The entire procedure could be performed on-line sufficiently quickly

to identify cells for targeted patch-clamp recordings. Signal-processing algorithms of MiniAnalysis software (Synaptosoft) were used to detect the onsets and offsets (time of half-amplitude decay) of calcium signals within the traces of individual cells. Active cells are neurons exhibiting at least one calcium event within the period of recording. Kinetics analysis of individual calcium events was performed using the MiniAnalysis program. Single and averaged events were fully characterized: rise times (10–90%), amplitudes, and decay time constants were calculated (single exponential fit). For SPA-associated events we chose to calculate the duration of individual calcium plateaus (time between the event onset and the start of the decay) instead of rise and decay times because the values of both parameters were negligible compared with the duration of the plateau. To compute the activity correlation of two cells, the onset of each event was represented by a Gaussian ($s = 1$ frame, to allow some jitter). The inner product of the resulting values was then calculated. The significance of each correlation value was estimated by direct comparison with a distribution computed from surrogate data sets, in which the events were randomly reshuffled in time. To quantify synchronous activity patterns (i.e., cENOs and cGDPs), we used four parameters: frequency, incidence, amplitude, and duration of synchronicity. The frequency of a network pattern was the averaged time interval between two peaks of synchronous activity. The incidence was the fraction of slices in which it could be recorded at least once. The amplitude of a network pattern in a given movie was the average of the maximum of cells coactive in each peak of synchrony across the movie. To identify peaks of synchronous activity that included more cells than expected by chance, we used interval reshuffling (randomly reordering of intervals between events for each cell) to create a set of surrogate event sequences. Reshuffling was performed 1000 times for each movie, and a surrogate histogram was constructed for each reshuffling. The threshold corresponding to a significance level of $p < 0.05$ was estimated as the number of coactive cells exceeded in a single frame in only 5% of these histograms. This threshold was used to calculate the duration of a synchronous activity pattern that is the number of successive frames for which the number of coactive cells was superior to threshold. Experimental values are given as means \pm SEMs. Student's t test and χ^2 test were used for statistical comparisons. $p < 0.05$ was considered significant.

Electrophysiology. Neurons were recorded using the patch-clamp technique in the whole-cell configuration. For voltage-clamp the composition of the intracellular solution was: 120 mM Cs-gluconate, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM Na₂ adenosine triphosphate, 10 mM HEPES. With this solution glutamate-R-mediated postsynaptic currents (PSCs) reversed at +10 mV while GABA_AR-mediated PSCs reversed at -60 mV. Liquid junction potential value was -16.8 mV, but no correction was applied. For current clamp, the intracellular solution was: 130 mM K-methylSO₄, 5 mM KCl, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM Mg-ATP, and 0.3 mM GTP. No correction for liquid junction potential was applied.

The osmolarity was 265–275 mOsm, pH 7.3. Microelectrode resistance was 4–8 MΩ. Uncompensated access resistance was monitored throughout the recordings. Values <20 MΩ were considered acceptable and the results were discarded if it changed by >20%. Whole-cell measurements were filtered at 3 kHz using a patch-clamp amplifier (HEKA, EPC10). Recordings were digitized on-line (20 kHz) with a Labmaster interface card to a personal computer and acquired using Axoscope 7.0 software (Molecular Devices). Synchronization between optical and electrical signals was achieved by feeding simultaneously the Labmaster interface card with the trigger signals for each movie frame and the electrophysiological recordings. Neurons were also patch clamped without dye loading. In these conditions, we found electrophysiological events corresponding to GDPs or ENOs similar to which we found in dye loading conditions. Recordings were analyzed using the MiniAnalysis software (Synaptosoft). Extracellular recordings were performed with a glass pipette (~1 MΩ) filled with ACSF and the signal was recorded with a DAM80 amplifier (WPI). Spectrograms were calculated using the function "spectrogram" of Matlab (MathWorks).

Pharmacology. Antagonists for GABA_A and ionotropic glutamate receptors mentioned in this manuscript are bicuculline (10 μM), gabazine (10 μM), NBQX (10 μM), and D-APV (40 μM). All drugs except TTX

(Tocris) were purchased from Sigma. As previously described (Min et al., 1998), GPT (porcine heart, 115 kDa dimer) was dialyzed for 3 h with a 10 kDa cutoff membrane (Slide-A-Lyzer, Pierce Chemical) before the experiments. We confirmed that GPT was acting by scavenging glutamate by comparing the current evoked by pressure application of glutamate (1 mM) onto the same neuron recorded in voltage clamp at +40 mV in the absence or in the presence of GPT 5 U/ml (together with pyruvate 2 mM) in the puff pipette. As expected, currents evoked in the presence of the glutamate scavenger were significantly smaller ($n = 12$, $p < 0.05$, data not shown). Finally, we also confirmed that GPT did not affect network activity in the absence of pyruvate (frequency and amplitude of cENOs under GPT 5 U/ml (without pyruvate) were not significantly different relative to control: $140 \pm 4\%$, $p = 0.4$ and $87 \pm 2\%$, $p = 0.6$, respectively, $n = 3$).

Results

Maturation of population coherence in neocortical slices

We used multibeam two-photon imaging in horizontal slices including the primary somatosensory cortex, loaded with a calcium indicator (fura-2 AM), to record movies of spontaneous activity in rats aged between E20 and P9. We focused on the somatosensory area (39,166 cells, 238 cells per movie on average; 4000 frames/movie, 100 ms/frame). Analysis was performed using custom software to measure fluorescence changes in each cell and mark the onset and offset of individual calcium transients (Fig. 1) (see also Crépel et al., 2007). Four maturation steps of spontaneous neuronal activity could be distinguished:

At embryonic stages (E20), only a minority of cells were active ($9 \pm 0.02\%$, $n = 11$ slices, 3190 cells). Most activity consisted of sporadic calcium spikes (6.3 ± 1.6 s duration, $n = 433$ events, Fig. 1) that were poorly correlated between neurons (0.07% cell pairs significantly correlated, see Materials and Methods). Current-clamp recordings from active neurons revealed that these calcium events corresponded to immature action potentials (Fig. 1).

Around birth (P0–P3), more cells generated calcium spikes but another pattern appeared in approximately one third of active cells ($32 \pm 3\%$ at P0, $n = 41$ slices) consisting of synchronous calcium plateaus (duration: 18.5 ± 2.3 s, 0.02 ± 0.001 Hz, $n = 493$ events, significantly different from calcium spikes in terms of duration, $p = 0.009$; 14% cell pairs significantly correlated) (Fig. 1). These were reminiscent of synchronous plateau assemblies (SPAs), recently described in the hippocampus (Fig. 1) (Crépel et al., 2007). Targeted current-clamp recordings showed that these plateaus corresponded to recurrent burst discharges when cells were recorded at V_{rest} ($n = 5$ cells) (Fig. 1). Like hippocampal SPAs, cortical SPAs (cSPAs) were not synapse driven since they were not affected by blocking AMPA/KARs, NMDARs, and GABA_ARs (fraction of SPA-cells in NBQX 10 μM, D-APV 40 μM, and bicuculline 10 μM, was $133 \pm 14\%$ of control, $n = 25$ slices, $p = 0.15$, data not shown). They were in contrast blocked by sodium and L-type calcium channel antagonists (to $15 \pm 6\%$ of control in the presence of TTX 1 μM and nifedipine 10 μM, $n = 3$ slices, $p = 0.003$, data not shown). Finally, as in the hippocampus, the emergence of cSPAs was controlled by signaling molecules involved during delivery since treatment with oxytocin (1 μM) of slices from rat fetuses (E20) having been initially intracardially perfused with ACSF to wash out the endogenous hormone, caused an almost two-fold increase in the fraction of SPA-cells to levels comparable to birth stages ($37 \pm 6\%$ of SPA-cells at E20 in the presence of OT, vs $18 \pm 2\%$ of SPA-cells in control at E20, $n = 25$ movies, 5369 cells, $p = 0.03$, data not shown). In contrast, the fraction of active cells relative to the total number of imaged neurons was not affected by the hormone (active cells: $9 \pm 2\%$ at E20 control vs $8 \pm 2\%$ at E20 in OT, $p = 0.67$).

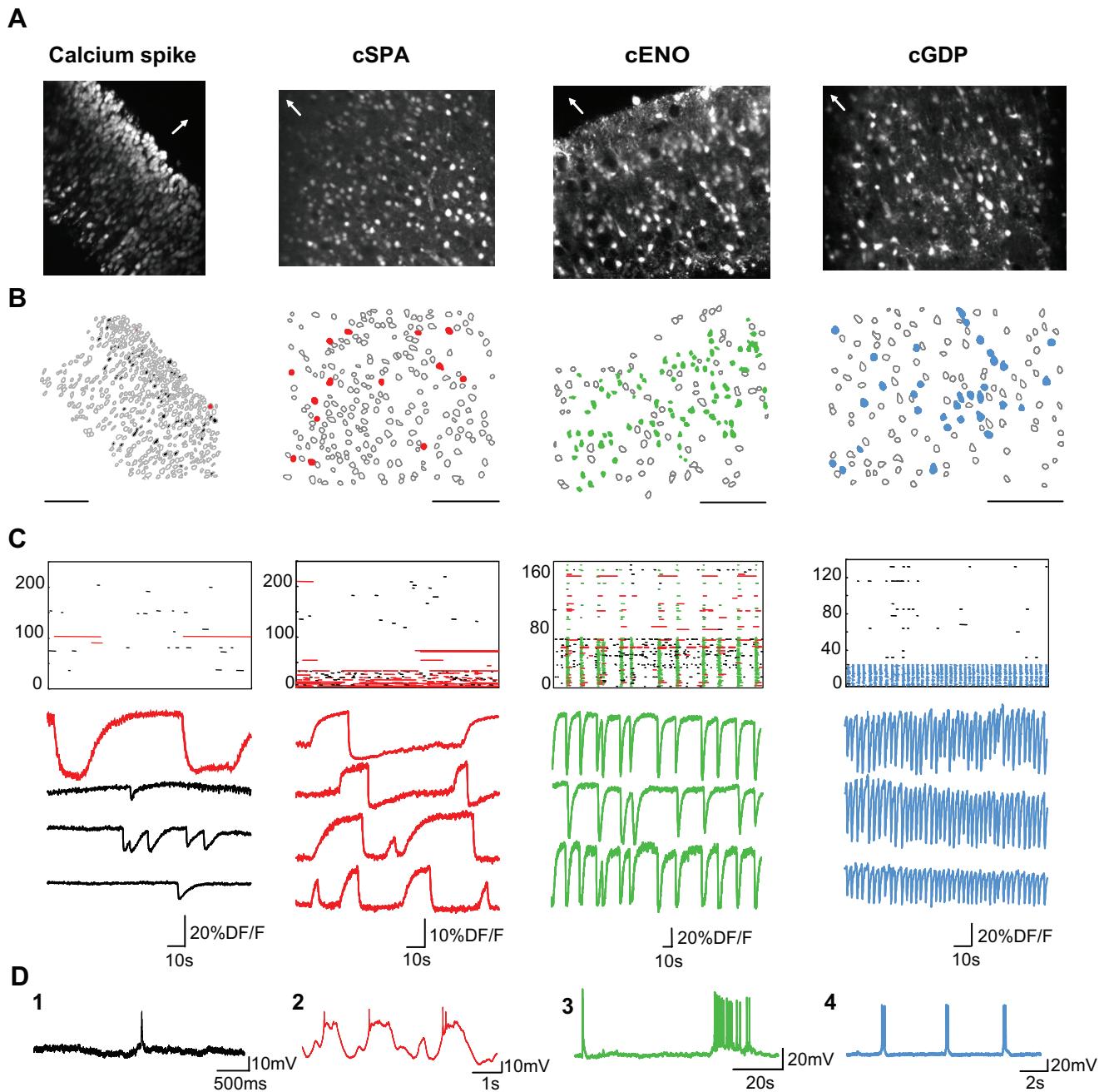


Figure 1. Multibeam two-photon imaging of the four maturation steps of spontaneous neuronal activity in somatosensory cortical slices from embryonic stages to first postnatal days. **A**, Two-photon calcium fluorescence images of rat somatosensory cortical slices of the four types of spontaneous activity: calcium spikes (left), cortical synchronous plateau assemblies (cSPAs), cortical early network oscillations (cENOs), and cortical giant depolarizing potentials (cGDPs, right) recorded at E20, P0 (cortical plate), P3 (cortical plate, horizontal slice), and P7 (deeper layers), respectively. White arrows indicate direction of pial surface. **B**, Automatically detected contours of the cells from the fluorescence images: open contours indicate silent cells, black filled contours indicate cells producing calcium spikes, red filled contours are cSPA cells, green filled contours are cENO cells, and blue filled contours are cGDP cells; scale bar: 100 μ m. **C**, Raster plots of the activity from the four slices illustrated in **A** in control ACSF. Each row represents a single cell and each horizontal line the duration of detected calcium transients. Four populations of events can be distinguished as shown by representative fluorescence traces below the raster plots (black: calcium spikes; red: calcium plateaus i.e., cSPA events; green: cENO events; blue: cGDP events). **D**, Current-clamp recordings (V_{rest} of approximately -60 mV) in four representative neurons displaying the four types of calcium activities described above. **D1**, A calcium spike recorded in a neuron at E20. **D2**, Red: cSPA recorded in a neuron at P0. Note that calcium plateaus are associated to rhythmic membrane potential oscillations as SPAs described in the hippocampus. **D3**, Green: a cortical ENO. **D4**, Blue: three successive cortical GDPs.

During the same developmental period as cSPAs were observed (P0–P3), we could image, in almost half of the slices, synchronous waves of calcium activity slowly invading the entire network and sharing spatiotemporal dynamics comparable to those previously described for cENOs (Figs. 1, 2, Table 1; supplemental Movie 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material) (Garaschuk et al., 2000; Corlew et al., 2004; Sun and

Luhmann, 2007). Indeed, they were associated with calcium events having slow kinetics (Fig. 3, Table 1) occurred at the same rate (1.5 ± 0.3 waves/min on average) during the same developmental period (P0–P5) (see Fig. 3), and could be detected in almost all neurons within a given cortical region (average fraction of active cells involved in cENOs was $81 \pm 3\%$). Even neurons involved in cSPAs tended to synchronize within ENOs (on aver-

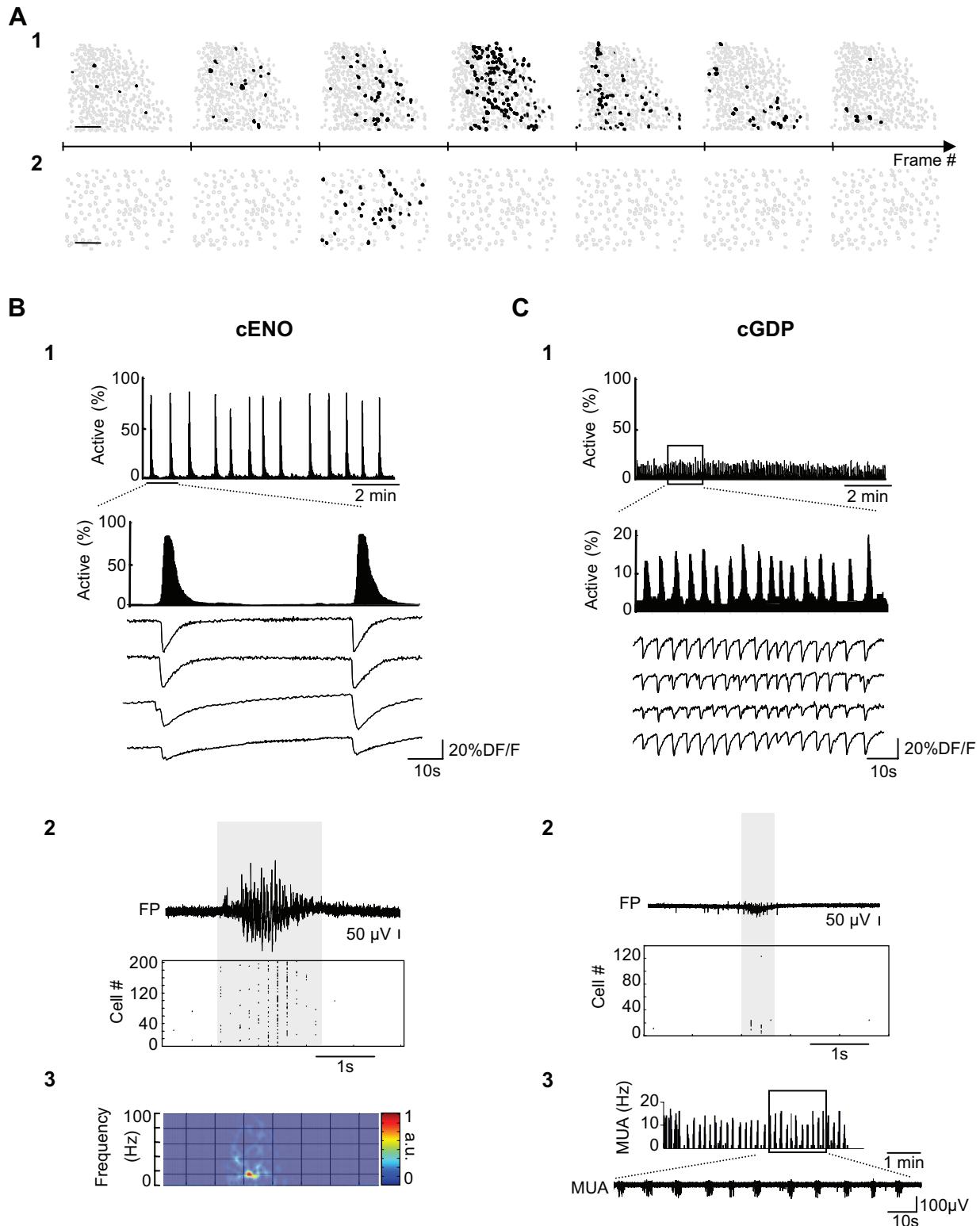


Figure 2. Cortical ENOs and GDPs display two distinct spatiotemporal dynamics. **A1, A2**, Contour maps of seven successive movie frames taken from a P3 (**A1**) and a P8 (**A2**) horizontal somatosensory slice to illustrate the slower dynamics of cENOs (**A1**) compared with cGDPs (**A2**). Black filled contours indicate cells active in frames where network synchronization reaches significance threshold (see Materials and Methods). One frame every 150 ms; scale bar: 100 μ m. **B1**, Histogram indicating the fraction of imaged cells detected as being active for each movie frame in a P1 horizontal somatosensory cortical slice. Each peak of the histogram represents a cENO. Calcium fluorescence traces of four cells implicated in the two cENOs illustrated in the above histogram on an expanded time scale. **B2**, Simultaneous field potential recording (FP) and calcium imaging (raster plot) during a cENO occurring in a P3 horizontal cortical slice. Raster plot indicates the onset of each calcium event in all imaged cells as a function of time. Note the strong correlation between field potential oscillations and multineuron calcium activity. **B3**, Spectrogram of the FP oscillation associated to the cENO illustrated in **B2**. a.u.: arbitrary units. **C1, C2**, Same as **A1** and **A2** but in a P6 somatosensory horizontal slice where cGDPs could be recorded (small peaks of synchrony). Note that peaks associated with cGDPs are much smaller and more frequent than those associated with cENOs (**B2**). They involve fewer cells as shown in the **C2** raster plot. **C3**, Cortical GDPs are not associated with any remarkable oscillatory pattern but correspond to a significant increase in MUA as shown by the frequency histogram of MUA as a function of time and by the MUA recording trace below.

age $71 \pm 4\%$ of SPA-cells were involved in cENOs in the form of synchronous calcium plateaus, $n = 6$). Interestingly, in contrast to other patterns described here, the incidence of these waves was significantly affected by the slice orientation (see Table 1 and Materials and Methods). These calcium waves were tightly correlated to changes in the field potential and increased multiunit activity (see Table 1, Fig. 2). Targeted current-clamp recordings performed while imaging indicated that these waves were associated with slowly rising and prolonged membrane potential depolarizations (Fig. 3, Table 1) whereas voltage clamp recordings indicated that they were associated with increased synaptic activity ($n = 11$) (see Fig. 5A3). Most importantly, these calcium oscillations presented the same pharmacological profile as cENOs since their occurrence was not affected by GABA_AR blockade ($p = 0.66$) (Table 1, Fig. 4), but completely prevented by AMPA/KAR and NMDAR antagonists (Table 1) ($p = 0.08$). Therefore the large calcium waves and field potential oscillations we recorded, corresponded to the previously described cENOs (Garaschuk et al., 2000). We have now provided the intracellular correlates for these network oscillations in voltage- and current-clamp recordings.

Last, starting from P6, a coherent pattern reminiscent of the GDPs initially described in the hippocampus (Ben-Ari et al., 1989), was recorded in almost half of the slices (46%, $n = 137$ slices, see also Table 1; supplemental Movie 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material) while the occurrence of cSPAs significantly declined (SPA-cells: $16 \pm 3\%$ of active cells in slices where cGDPs could be recorded, $n = 24$ movies, $p = 0.0002$) (Fig. 3). Pharmacological and electrophysiological observations indicated that this pattern indeed corresponded to GDPs. Cortical GDPs consisted of recurrent synchronous calcium oscillations occurring on average at 0.1 Hz (0.14 ± 0.01 Hz, see Table 1) and involving a subpopulation of neurons ($13 \pm 3\%$ neurons involved on average, $n = 24$ slices). They were often confined within deeper cortical layers (Fig. 1) and always associated to fast calcium events (see Table 1, Fig. 3) occurring simultaneously within one movie frame (i.e., <100 ms) (Fig. 2). Extracellular recordings further confirmed that these synchronous fast calcium events were associated to field potential changes and to a marked increase in multiunit activity (Fig. 2, Table 1). These oscillations were strongly dependent on the actions of GABA as they were almost completely blocked by the GABA_AR antagonist (bicuculline 10 μ M, $n = 9$ slices) (Fig. 4, see Table 1). As in the hippocampus, cGDPs also required glutamatergic transmission since their frequency was significantly re-

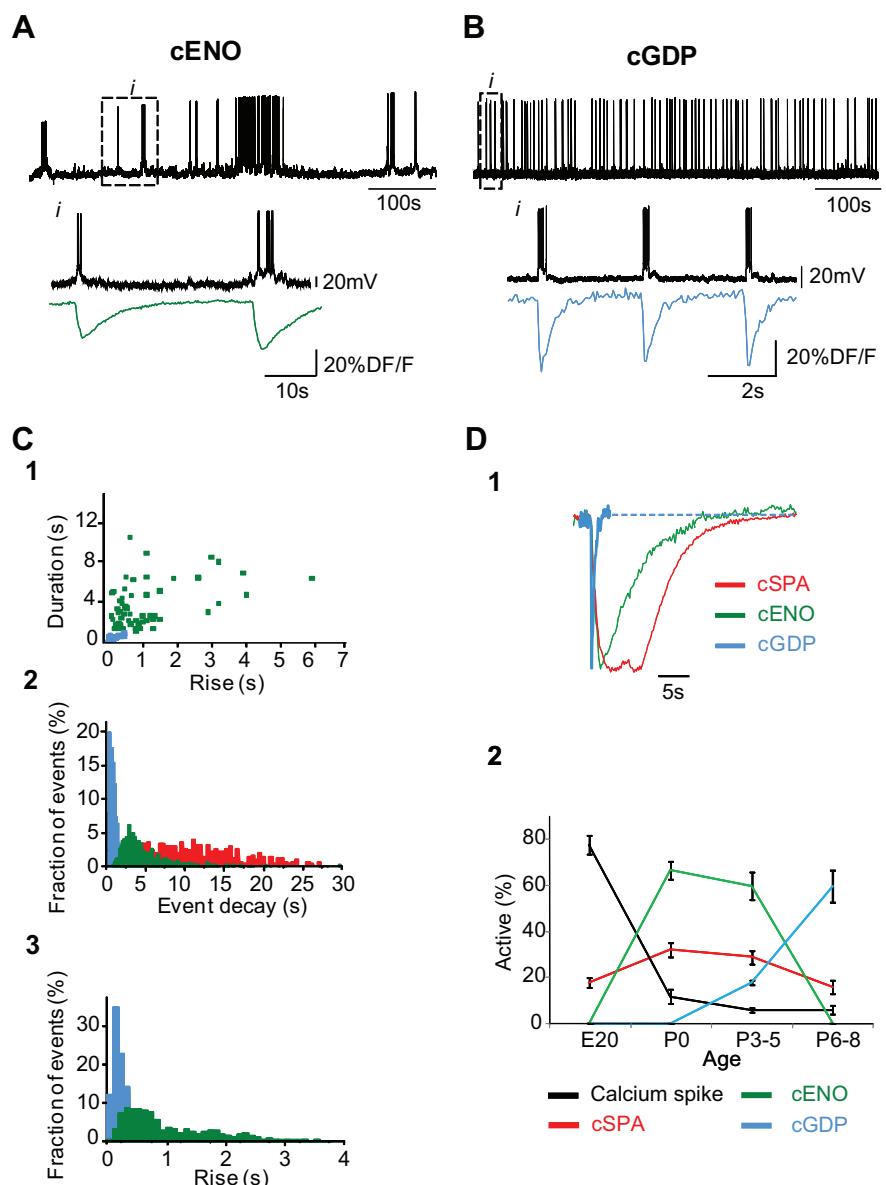


Figure 3. Single-cell electrophysiological and calcium events associated with cortical ENOs and GDPs. **A, B**, Current-clamp recordings at resting membrane potential and corresponding calcium fluorescence traces (bottom traces) of cells implicated in cENOs (**A**) and cGDPs (**B**). Recording periods indicated in *i* are illustrated on an expanded time scale. **C1**, Plots of the duration versus rise time of individual membrane potential oscillations associated with cGDPs (blue squares, $n = 4$ cells, 75 events) and cENOs (green, $n = 5$ cells, 65 events). **C2**, **C3**, Normalized distribution of the decay (2) and rise (3) times of single calcium events associated with cGDPs (blue, $n = 1000$) and cENOs (green, $n = 1000$). Distribution of the duration of the calcium plateaus associated with cSPAs (red, $n = 500$, see Materials and Methods) is also plotted in **C2**. **D1**, Comparison of three representative normalized calcium fluorescence traces recorded in single cells during cGDPs, cENOs, and cSPAs clearly illustrates the kinetics difference between these events. **D2**, Graph indicates the fraction of calcium spike-, cSPA-, cENO-, and cGDP-cells relative to the number of active cells at four successive age groups between embryonic to first postnatal stages. Error bars indicate SEMs.

duced by blockade of AMPA/KARs and NMDARs (to $14 \pm 14\%$ of control values in NBQX 10 μ M, D-APV 40 μ M, $n = 6$ slices, $p = 0.004$) (Fig. 5). However, the fraction of cells involved in cGDPs was not significantly affected by AMPA/KAR and NMDAR blockers (to $80 \pm 17\%$ of control, $n = 6$, $p = 0.2$). Last, current-clamp recordings confirmed that these calcium oscillations corresponded to recurrent suprathreshold membrane potential depolarizations (Table 1, Figs. 1, 3) whereas voltage-clamp recordings validated that they were associated with bursts of synaptic postsynaptic events (sPSCs, $n = 4$) (Fig. 5B3 and Materials and Methods).

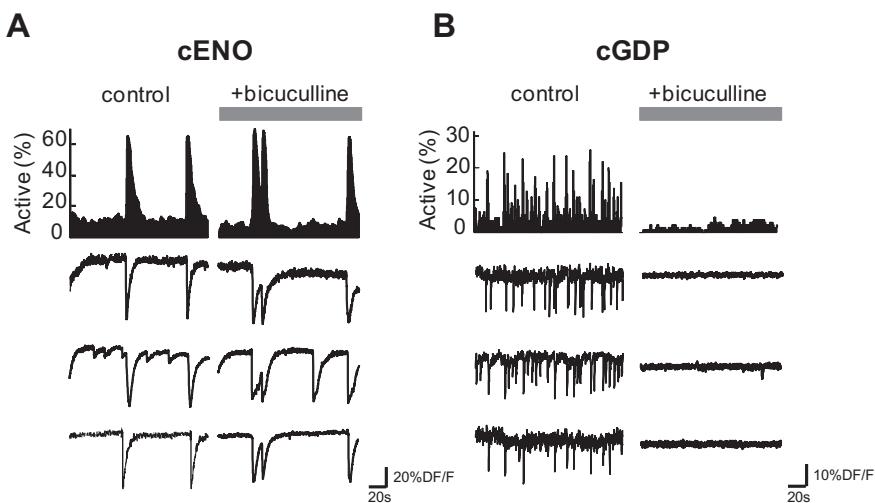


Figure 4. GABAergic transmission is not involved in the generation of cENOs but is crucial for cGDPs. **A**, **B**, Representative histograms indicating the fraction of imaged cells detected as being active for each movie frame as a function of time in a P3 (**A**) and a P8 (**B**) somatosensory horizontal slice. The occurrence of cENOs (peaks of synchrony in **A**) was not significantly affected in the presence of the GABA_AR antagonist (bicuculline, 10 μ M) compared with control conditions. In contrast, cGDPs (peaks of synchrony in **B**) were blocked in the presence of bicuculline. Below, Calcium fluorescence traces of three representative cells implicated in cENOs (**A**) and cGDPs (**B**) in control and after adding bicuculline.

Therefore, we found a sequence for the maturation of population coherence in the neocortex almost similar to the one previously described in the hippocampus (Crépel et al., 2007) except from the fact that two synapse-driven network patterns (cENOs and cGDPs), sequentially led the developing neocortex.

Cortical ENOs differ from cortical GDPs

Figures 2–7 illustrate the major differences between cENOs and cGDPs recorded at the time when they dominate the activity of the immature cortical network (P0–P3 for cENOs and P6–P8 for cGDPs) (see Fig. 3D2). A comparative quantitative description of these two coherent patterns is provided in Table 1. Most electrophysiological and optical measurements used to assess network activity, including kinetics of individual calcium events, spatio-temporal dynamics, rates of occurrence or duration, significantly differed between cENOs and cGDPs ($p < 0.05$). Moreover, whereas both types of activity required synaptic transmission (as assessed with voltage clamp recordings), cENOs were glutamate driven, whereas GABA plays a critical role in the generation of cGDPs (see above). We next performed a series of experiments aimed at further discriminating between the mechanisms of generation of cENOs and cGDPs. First, we observed that NMDAR blockade alone significantly affected the occurrence of cENOs (to $21 \pm 15\%$ of control in D-APV 40 μ M, $n = 11$, $p = 0.002$) (Table 1, Fig. 5), compared with cGDPs (to $70 \pm 5\%$ of control in D-APV 40 μ M, $n = 5$, $p > 0.05$) (Table 1, Fig. 5) further confirming the crucial role of NMDAR activity in the generation of synchronous network oscillations in the immature neocortex (Garaschuk et al., 2000; Demarque et al., 2004; Dupont et al., 2006). The major contribution of NMDARs activation to the synaptic influx associated with cENOs was further established by measurements of their current–voltage relationship. Indeed, I/V curves associated with cENOs displayed a region of negative slope at hyperpolarized membrane potentials and reversed polarity close to 0 mV (2.5 ± 1.4 mV, $n = 4$ cells) (Fig. 5) whereas I/V curves corresponding to cGDPs were linear and reversed at more negative values (-40.5 ± 0.5 mV, $n = 4$ cells) (Fig. 5) clearly indicating an important GABA_AR contribution. Interestingly, in addition to

mediating cENOs-associated PSCs, we observed, in a majority of tested neurons (57%, $n = 14$, P1–P3), that NMDARs also provided a constant membrane potential depolarization most likely sustained by a tonic NMDAR current, since addition of D-APV induced a reversible hyperpolarization at resting membrane potential in current-clamp recordings (-6.3 ± 2.3 mV, $n = 4$) (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and an outward current at +40 mV in voltage-clamp mode (22 ± 6 pA, $n = 4$) (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Part of these effects was specific for younger rats (P1–P3). Indeed, NMDAR blockade did not affect resting membrane potential at developmental stages when cENOs are no longer observed (P8–P9, $n = 6$) (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material), whereas D-APV application still produced an outward current at +40 mV in voltage-clamp mode (15 ± 3 pA, $n = 3$).

As the above experiments suggested a contribution of NMDAR-driven tonic depolarization to the generation of cENOs, we decided to test whether such depolarization could be mimicked by elevating extracellular potassium concentrations in the presence of D-APV. Indeed, similar experiments were conducted in a previous study to argue that a tonic depolarizing drive provided by excitatory GABAergic transmission was instructive for the generation of hippocampal GDPs (Sipilä et al., 2005). We observed that if synchrony could be restored by 8 mM extracellular potassium, it was difficult to compare such network events to control cENOs since their amplitude was significantly decreased (to $43 \pm 8\%$ of control, $n = 8$, $p = 0.013$) while their frequency tended to increase ($335 \pm 171\%$, $n = 5$, $p = 0.135$) (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Likewise, in slices where cGDPs occurred (P8–P9), we observed that peaks of synchronous activity could indeed be restored in the presence of the GABA_AR antagonist (gabazine 10 μ M) after increasing the extracellular potassium concentration to 8 mM, but that the dynamics of the network patterns thus induced was heterogeneous and could not be compared with control cGDPs. Their amplitude and frequency significantly differed ($p < 0.05$, $n = 9$) (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In particular, large-amplitude ($342 \pm 7\%$ of control, $n = 6$), low-frequency ($31 \pm 4\%$ of control, $n = 6$) synchronizations appeared, associated with three-times slower calcium events (average decay was $336 \pm 57\%$ of control, $n = 4$, $p = 0.03$). In 6 of 9 experiments in high potassium conditions, large population events could be observed. These events, which invaded the entire slice including regions that did not display any synchronous activity pattern in control, are likely to correspond to the occurrence of epileptiform activity. To conclude, both cENOs and cGDPs are complex emergent network patterns that cannot be reliably mimicked by pharmacological manipulations.

The slow kinetics of cENO-associated calcium and electrophysiological events, the tonic glutamate current, as well as the immature synaptic connectivity and neuronal excitability around birth in the neocortex (Corlew et al., 2004; Moody and Bosma, 2005) suggested that the action of glutamate during cENOs could

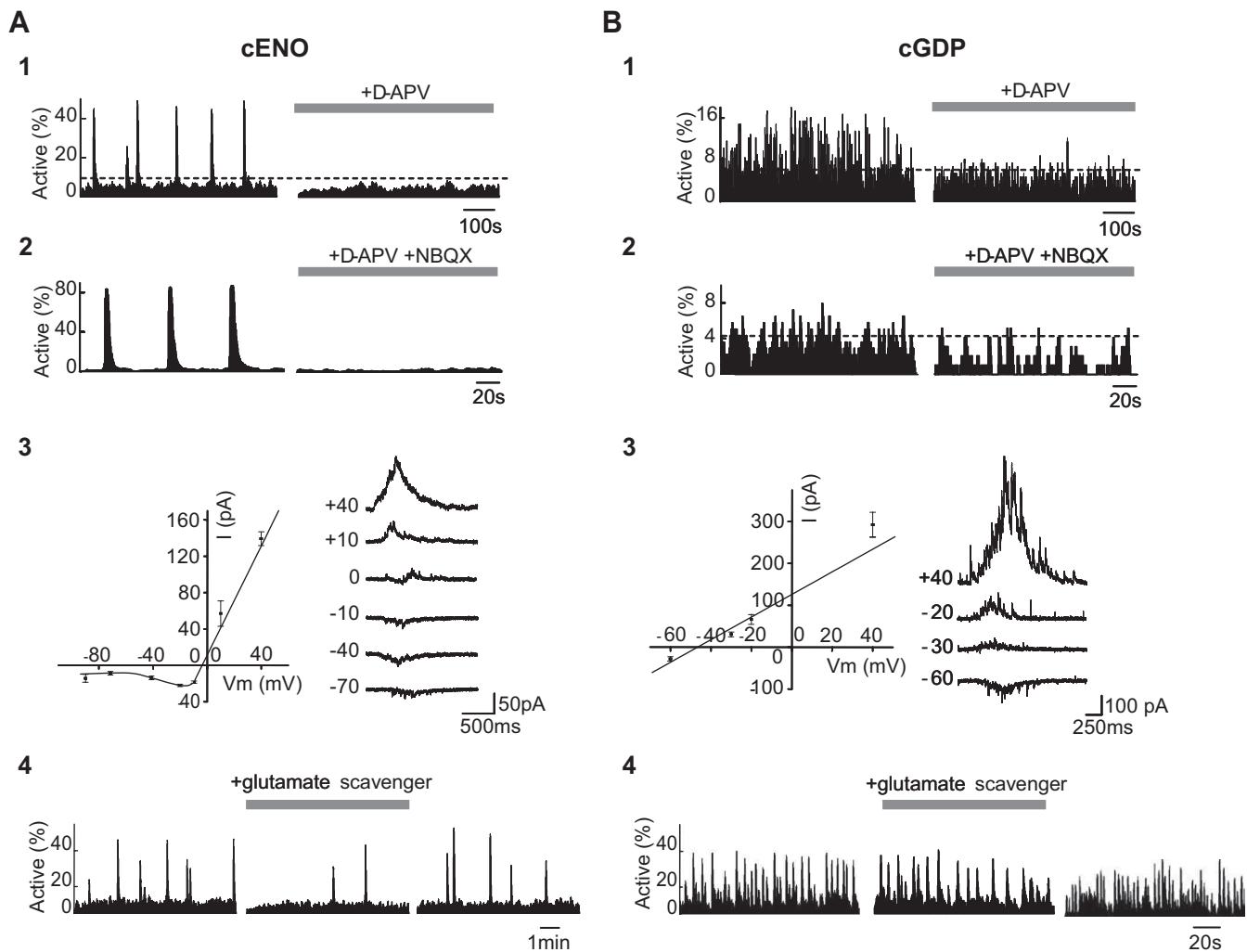


Figure 5. Differential role of glutamate in the generation of cortical ENOs and GDPs. **A1**, Histograms indicating the fraction of imaged cells detected as being active for each movie frame as a function of time in a P0 somatosensory horizontal slice. The occurrence of cENOs (peaks of synchrony, left histogram) was strongly reduced when the NMDAR antagonist (D-APV , $40 \mu\text{M}$) was added to the saline (right histogram). Dashed horizontal line indicates statistical significance threshold. **A2**, Same type of histograms as in **A1** showing that the occurrence of cENOs was fully blocked in the presence of both NMDAR and AMPA/KAR antagonists (D-APV , $40 \mu\text{M}$ and NBQX , $10 \mu\text{M}$, right histogram). **A3**, Left, Average current–voltage relationship of cENO-associated postsynaptic currents (PSCs, 5 cENOs–PSCs averaged for each point) obtained in a representative cortical neuron. I/V curve displays a negative slope at negative membrane potential values and reverses around 0 mV , indicating a strong contribution of NMDARs. Error bars indicate SEM. Right, Representative traces of PSCs associated with cENOs at different holding potentials from the same recorded neuron. **A4**, Same type of histograms as in **A1** in a P1 somatosensory horizontal slice, showing that perfusion with the enzymatic glutamate scavenger (GPT 5 U/ml with pyruvate 2 mM) significantly reduces the frequency of cENOs (peaks of synchrony). The effect of GPT is reversible upon wash out of the drug (right histogram). **B1**, D-APV had a significantly smaller effect on the occurrence of cGDPs compared with cENOs (see **A1**). Dashed horizontal line indicates significance threshold; **B2**, Blockade of ionotropic glutamatergic transmission almost completely prevented the occurrence of cGDPs. **B3**, Same as **A3**, but current–voltage relationship of cGDP–PSCs is linear and reverses close to -50 mV , indicating a strong contribution of GABA_{A} Rs. **B4**, Same experiments as in **A4** but in a P8 slice, showing that GPT (5 U/ml) does not affect cGDPs as much as cENOs (see **A4**).

also involve transmitter diffusion or accumulation in the extracellular space. In a first attempt to test this hypothesis, we altered the spatiotemporal glutamate profile without interfering with transmitter release or with glutamate receptors uptake mechanisms (Min et al., 1998). We used glutamic-pyruvic transaminase (GPT, alanine transaminase, EC 2.6.1.2) an enzymatic glutamate scavenger to enhance the clearance of glutamate. GPT (5 U/ml) applied together with pyruvate (2 mM) catalyzes the conversion of glutamate and pyruvate to α -ketoglutarate. Test experiments were performed to confirm the specificity of the scavenger for glutamate (see Materials and Methods). We observed that perfusion with GPT (5 U/ml) significantly prevented the occurrence of cENOs (cENO frequency and amplitude decreased to $19 \pm 8\%$ and $49 \pm 13\%$ of control values respectively, $n = 9$ slices, 2426 cells, $p < 0.001$) (Figs. 5, 7B) compared with cGDPs (frequency

was $99 \pm 22\%$ of control, $p = 0.67$). If the frequency of cGDPs was not affected by the glutamate scavenger, the fraction of cells involved in them was modified since cGDPs amplitude decreased to $64 \pm 7\%$ of control values in the presence of GPT ($n = 7$ slices, 2195 cells, $p = 0.03$) (Fig. 5). Separate voltage-clamp recordings were performed to verify that GPT (5 U/ml and pyruvate) did not block evoked NMDAR-mediated synaptic currents (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

These experiments therefore argued for a critical role of glutamate and NMDAR activation in the generation of cENOs but not cGDPs. Since increases of extracellular glutamate concentration leading to transmitter diffusion are frequently associated to anoxic brain episodes (Volterra et al., 1994; Takahashi et al., 1997; Rossi et al., 2000; Auld and Robitaille, 2003) and since most

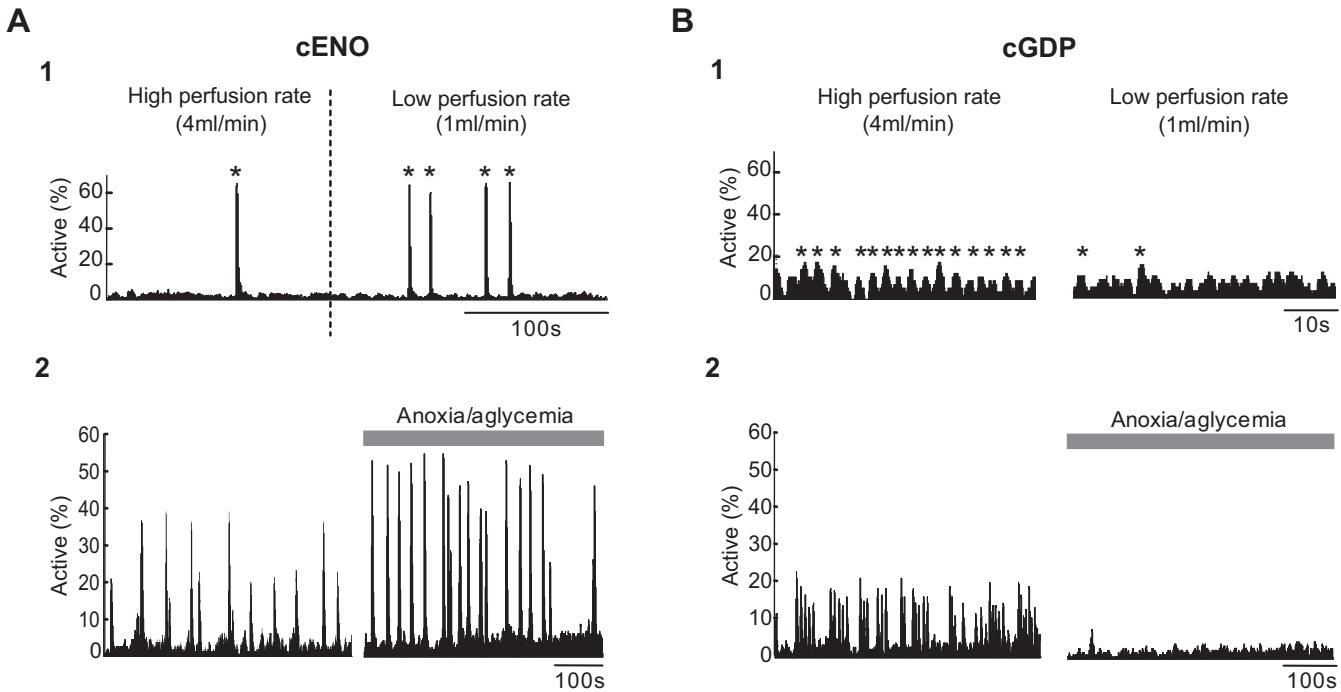


Figure 6. Perfusion rate and anoxic/aglycemic episodes differentially affect cENOs and cGDPs. **A1**, Histograms indicating the fraction of imaged cells detected as being active for each movie frame as a function of time in a P2 somatosensory horizontal slice. The frequency of cENOs (peaks of synchrony indicated by *) was significantly increased when decreasing the rate of ACSF perfusion from 4 to 1 ml/min. Dashed line indicates the time when perfusion rate was modified. **A2**, Same histograms as in **A1** in a P3 horizontal cortical slice. The frequency of cENOs (peaks of synchrony in the histogram) was significantly increased compared with control (left histogram) after 5 min of anoxia/aglycemia (right). **B1**, **B2**, Same as **A** but in a P7 somatosensory horizontal slice where cGDPs could be recorded (small peaks of synchrony indicated by *). In contrast to cENOs (**A**), the frequency of cGDPs was dramatically decreased in low perfusion conditions (**B1**, right) as well as after 5 min of anoxia/aglycemia (**B2**, right).

previous experiments describing cENOs were performed at relatively low perfusion rates (~ 1 ml/min, Corlew et al., 2004), we hypothesized that cENOs could be favored by slowing down perfusion or triggering anoxic conditions. Thus, decreasing the perfusion rate (from 4 to 1 ml/min) significantly increased the frequency of ENOs (to $359 \pm 156\%$ of control values, $n = 4$ slices, 1232 cells, $p = 0.005$) (Fig. 6). On the contrary, as reported in the hippocampus (Dzhala et al., 1999), the occurrence of cGDPs was impaired by a similar procedure (to $45 \pm 26\%$, $n = 2$ slices, 227 cells) (Fig. 6).

We also tested the temperature dependence of both patterns and observed that their occurrence was stable between 30 and 34°C, but significantly decreased by lowering the temperature to room temperature values ($\sim 22^\circ\text{C}$, data not shown). Interestingly, when reproducing the previously described “temperature drop” protocol (Yuste et al., 1995) that consists in perfusing slices with a bolus of cold saline ($\sim 4^\circ\text{C}$), we could trigger synchronous calcium events in neuronal clusters clearly resembling “neuronal domains” (Yuste et al., 1992; Yuste et al., 1995, $n = 2$ slices, data not shown). Brief episodes (~ 5 min) of anoxia/aglycemia were induced by superfusion with a solution in which oxygen was substituted for nitrogen and glucose for sucrose (Dzhala et al., 1999). These experimental conditions differentially affected cENOs and cGDPs since we observed: (1) in experiments performed when cENOs dominate the neocortical network (P0–P3), a transient but significant increase in the frequency of cENOs occurring ~ 2 min after the beginning of anoxic conditions (to $234 \pm 54\%$ of control values, $n = 9$, $p = 0.03$) (Figs. 6, 7A); in addition, a significant increase of cENOs amplitude was observed just after reoxygenation (to $124 \pm 9\%$ of control values, $n = 9$, $p = 0.01$); (2) a significant reduction in the frequency and ampli-

tude of cGDPs during anoxia and persisting up to 8 min after reoxygenation (to $25 \pm 17\%$ and $24 \pm 15\%$ of control values respectively, $n = 4$, $p = 0.03$) (Figs. 6, 7A). We conclude that cENOs are physiologically present in horizontal slices but favored by hypoxic conditions, most likely due to their strong dependence on glutamate levels. In contrast, experimental anoxia depresses cGDPs, which emerge later during development.

Still, cENOs and cGDPs could be the expression of the same network pattern supported by different cellular mechanisms because they are observed at separated developmental stages as described for cholinergic oscillations (Dupont et al., 2006) or retinal waves (Syed et al., 2004). To test this hypothesis, we performed experiments during the transition period (P4–P5) between ENO- and GDP-dominated networks. In a rare portion of imaged slices (2 of 17), we could simultaneously image two network patterns with significantly distinct dynamics (Fig. 7): (1) slow ENO-like calcium waves involving a large fraction of cells and occurring on average 2 times/min and (2) faster GDP-like recurrent (0.12 Hz) synchronizations between localized groups of neurons. Both patterns most likely corresponded to simultaneously imaged cENOs and cGDPs since the former was selectively blocked when the enzymatic glutamate scavenger GPT was added to the saline, whereas the latter was specifically impaired in anoxic/aglycemic conditions (Fig. 7). We conclude that cENOs and cGDPs are two distinct network patterns.

Discussion

The main finding of the present study is that NMDAR-driven ENOs and GABA_AR-driven GDPs are two distinct network patterns, sequentially expressed in immature neocortical structures, characterized by different spatiotemporal dynamics both in elec-

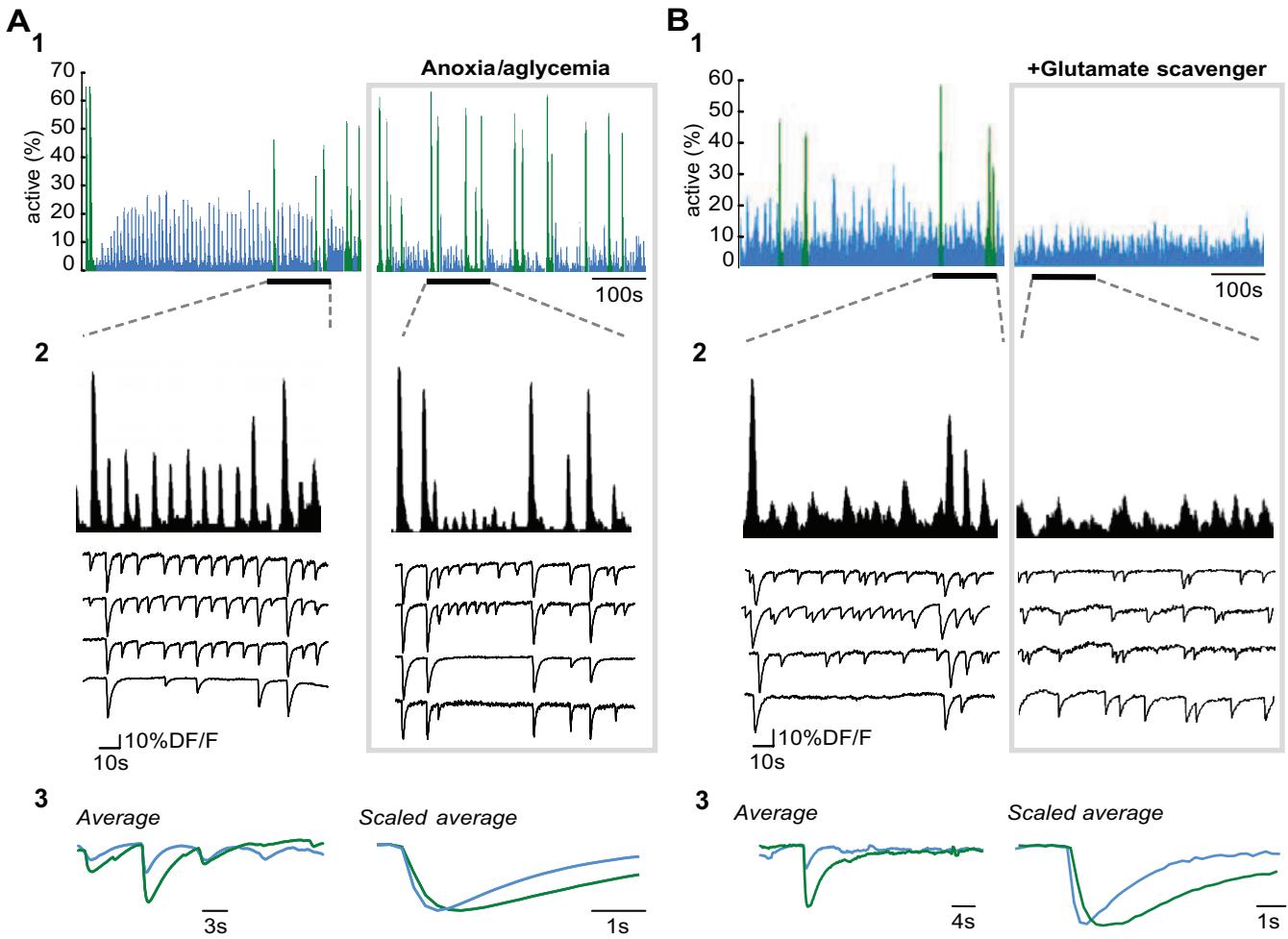


Figure 7. Differential modulation of cENOs and cGDPs, simultaneously recorded in a neocortical slice. **A1**, Histograms indicating the fraction of imaged cells detected as being active for each movie frame as a function of time in a P5 somatosensory horizontal slice in control (left) and during anoxic/aglycemic conditions (right, 164 ms per frame). Two types of synchronous network events can be distinguished: cGDPs (blue) are smaller amplitude highly recurrent synchronizations associated to fast and small amplitude calcium transients and cENOs (green) are less frequent large peaks of synchrony associated to slower and larger calcium transients. Perfusion with anoxic/aglycemic ACSF increases the frequency of cENOs but reduces that of cGDPs. **A2**, Same histograms as in **A1** but on an expanded time scale for the time period indicated in **A1** by a horizontal bar. Representative calcium fluorescence traces from four imaged cells illustrating the amplitude and kinetics difference between cENO and cGDP-associated calcium events. **A3**, Comparison of all the digitally averaged calcium fluorescence events associated to cENOs (green) and cGDPs (blue) from the entire duration of the recording clearly indicates the amplitude difference between the two network patterns. Comparison of the scaled digital averages shows that the rise and decay time constants of cENOs-associated calcium transients are significantly slower than those associated to cGDPs (rise time: 1.0 vs 0.6 s; decay: 5.7 vs 1.6 s). **B**, Same as **A**, but comparing control and perfusion with the enzymatic glutamate scavenger (GPT 5 U/ml with pyruvate 2 mM) Perfusion with GPT (5 U/ml) selectively blocks the occurrence of cENOs (green) without significantly affecting cGDPs (blue).

trical and optical recordings. Most importantly, we show that cENOs are effectively modulated by extracellular glutamate levels. This unique feature imparts to the immature cerebral cortex a critical sensitivity to pathological transmitter accumulations, such as those occurring during anoxic episodes.

Electrophysiological and single-cell correlates of calcium oscillations in the immature neocortex

In this study we have chosen to perform a compound description of population activity to gain the best resolution and assess the spatiotemporal features of any organized activity pattern, even discrete and localized. Whereas activity is poorly correlated at embryonic stages, large scale calcium waves abruptly emerge at birth in horizontal neocortical slices; these calcium events correspond to the extensively described ENOs (Garaschuk et al., 2000; Corlew et al., 2004; McCabe et al., 2006, 2007) as they present similar dynamics (i.e., calcium kinetics, amplitude, rate of occurrence), developmental profile, temperature sensitivity, and pharmacological properties.

Most imaging studies describing cENOs (Garaschuk et al., 2000; Corlew et al., 2004; McCabe et al., 2006, 2007) were performed in horizontal slices and surprisingly we could indeed record them only in ~5% of imaged coronal slices. This would indicate that cENOs are better supported when some anatomical connections are spared, most likely the rostrocaudal organization within layers rather than the intralaminar circuitry (Fleidervish et al., 1998). In agreement with this, spontaneous oscillatory network activity similar to cENOs could be recorded with MEA chips in thick coronal cortical slices, but much more infrequently (Sun and Luhmann, 2007). In our study we confirmed that cENOs are associated with (1) field potential oscillations and increased multiunit activity (MUA) validating that they result from synchronous population discharges; (2) sustained membrane potential depolarization that could lead to action potential firing; and (3) a barrage of NMDAR driven EPSCs. This work therefore provides the first comprehensive description of the electrophysiological correlates underlying cENOs.

Cortical ENOs and cGDPs are different network patterns

One recent study aimed at separating between different oscillatory network electrical activities (Sun and Luhmann, 2007) using MEA recordings but the description was restricted to P0–P3 and a clear correlate with calcium imaging studies could not be established. Here we find that cENOs and cGDPs represent different patterns since:

First, the expression of cENOs peaks around birth (P0–P3) and they are no longer present when cGDPs dominate the network (P6–P8). There is a transition period (P4–P5) during which both patterns can be simultaneously recorded. Second, cENO-associated calcium events are five times slower than cGDPs and neuronal activity builds up within ~1 s in contrast to cGDPs that synchronize neurons within <200 ms. Also, cENOs-associated membrane potential oscillations are 10 times slower (3 s on average) than cGDP-associated events. Even at their expression peak (P0–P3), cENOs are rare events compared with cGDPs which are on average 4 times more frequent. Moreover, cENOs are large propagating waves that involve most neurons in contrast to GDPs which are often confined involving on average only one tenth of the imaged population. This difference indeed reflects different generating and propagating mechanisms (see below). In addition, cENOs are largely supported by synaptic NMDAR but not GABA_AR activation, in contrast to cGDPs, and depend on extracellular glutamate concentrations as initially hypothesized (Garaschuk et al., 2000). Indeed, cENOs are blocked by a glutamate scavenger. Moreover, we show that a tonic NMDAR-mediated glutamate current most likely contributes to the resting membrane potential and excitability of some neurons preferentially at the stage where cENOs are expressed. However, it should be noted that real resting membrane potential conditions are difficult to assess at early stages when neurons are small due to errors in measurement (Tyzio et al., 2003). Interestingly, NMDAR activation has been critically implicated in several cortical oscillations at early developmental stages, including most pharmacologically induced patterns (Dupont et al., 2006; Demarque et al., 2004). A variation in the subunit composition of NMDARs in intracortical synapses (Kumar and Huguenard, 2003; Nevian and Sakmann, 2004; Pérez-Otaño et al., 2006), a weaker sensitivity to magnesium block near resting potential (Ben-Ari et al., 1988; Fleidervish et al., 1998; Binshtok et al., 2006; Cattani et al., 2007) or high glutamate affinity are features that should support their activation by ambient glutamate. Finally, cENOs and cGDPs are differentially affected by anoxic conditions since slowing down the perfusion rate and/or producing mild anoxic conditions blocks cGDPs and increases the frequency of cENOs. Blockade of hippocampal GDPs in similar conditions results from a depression of synaptic activity by endogenous adenosine released during anoxia acting via presynaptic receptors (Dzhala et al., 1999).

ENOs are likely to be a pattern specific to developing neocortical structures. A particular sensitivity of neocortical neurons to glutamate transport function (Furuta et al., 1997; Kidd and Isaac, 2000; Demarque et al., 2004) and a specific expression of functionally distinct NMDARs might explain this restricted expression of ENOs in the neocortex. In contrast to cENOs, SPAs can be recorded both in the hippocampus (Crépel et al., 2007) and neocortex; SPAs therefore seem a general pattern of network maturation. As in the hippocampus, cortical SPAs peaked at birth, were boosted by application of the maternal hormone oxytocin and started declining when cGDPs could be observed. SPAs and cENOs shared similar developmental profiles and could occur synchronously but the exact interaction between these two patterns needs to be further investigated; cSPAs

could be involved in the generation of cENOs by providing, for example, few cells with a depolarized membrane potential suitable for NMDAR activation.

Interestingly, cENOs and cGDPs coexist during a short period. If future studies are required to understand the cellular basis for the handover of synchrony between cENOs and cGDPs, a maturation of glutamate transporters function (Demarque et al., 2004), a developmental switch in NMDAR properties in neocortical neurons (Crair and Malenka, 1995; Pérez-Otaño et al., 2006), a decline of the SPA pattern and a postnatal development of GABAergic circuits (Chattopadhyaya et al., 2004; Hensch and Stryker, 2004; Minlebaev et al., 2007) are likely to be critical determinants for this transition.

In vivo correlates and possible function of early cortical activity patterns

Studies in neonatal rodents *in vivo* have characterized an early pattern of synchronized cortical electrical activity (Khazipov et al., 2004; Hangartner et al., 2006; Khazipov and Luhmann, 2006; Minlebaev et al., 2007), the “spindle-bursts” that are most likely homologous to human premature delta brushes recorded in EEG (Milh et al., 2007b). Due to their comparable dynamics (i.e., rate of occurrence, duration), similarly confined spatial distribution and developmental profile (Khazipov et al., 2004; Hangartner et al., 2006; Khazipov and Luhmann, 2006; Minlebaev et al., 2007), “spindle bursts” could be the *in vivo* expression of slice cGDPs. Besides, the disappearance of both spindle bursts and delta brushes tightly parallels the maturation of functional GABAergic inhibition supporting a crucial implication of this neurotransmitter in their generation (Dzhala et al., 2005; Vanhatalo et al., 2005). However, only a small fraction of the *in vivo* spindle bursts are intrinsically generated in the cortex independently from the periphery (Khazipov et al., 2004; Hangartner et al., 2006; Khazipov and Luhmann, 2006; Minlebaev et al., 2007). Therefore, future studies combining *in vivo* cellular calcium imaging and electrical recordings are required to clarify the link between cGDPs and spindle bursts.

Cortical calcium waves sharing similarities with slice cENOs have been described *in vivo* in unanesthetized rats by recordings of the integrated calcium signal from populations of cells (Adelsberger et al., 2005). The major common point between these *in vivo* calcium waves and slice cENOs was that they propagated to the entire cortical mantle in contrast to “spindle bursts.” But it is worth noting that *in vivo* calcium waves occurred more frequently and at later developmental stages than *in vitro* ENOs (Garaschuk et al., 2000; Adelsberger et al., 2005). This study therefore strongly suggests that the *in vivo* counterpart of cENOs is likely to be an endogenous brain rhythm expressed during sleep-like resting states and disappearing during the animal movement (Adelsberger et al., 2005). Unfortunately, the *in vivo* pattern of electrical activity as well as the human EEG correlate of cENOs remains to be determined. The normal EEG of premature infants displays a wide variety of discontinuous activity patterns as a function of age (Lamblin et al., 1999; Vanhatalo et al., 2002; Tolonen et al., 2007; Vecchierini et al., 2007). Furthermore, full band EEG recordings indicate the initial abundance of very slow activity patterns that could translate into cENOs (Vanhatalo et al., 2002; Tolonen et al., 2007; Vecchierini et al., 2007). Finding the *in vivo* electrical pattern corresponding to cENOs will require recordings in unanesthetized animals around birth.

Probably the most unique property of cENOs is their being enhanced by anoxic conditions. It is the first time, to our knowl-

edge, that a developmental network pattern was shown not to be altered but rather reinforced by pathological conditions. This property most likely derives from the strong sensitivity of cENOs to extracellular glutamate levels. Glutamate uptake by astrocytes was shown to be disrupted by hypoxia (Dallas et al., 2007). The astrocytic network might indeed be implicated in the control of cENOs even in normoxic conditions (Aguado et al., 2002). Interestingly, hypoxic-ischemic encephalopathy in human neonates is very often associated to discontinuous EEG patterns including “suppression bursts,” which dynamics and suggested cellular mechanisms can be intriguingly similar to cENOs (Biagioli et al., 1999; Ohtahara and Yamatogi, 2003; Demarque et al., 2004; Milh et al., 2007a). Future studies should determine whether indeed ischemic episodes within a critical window period of fetal development will lead to the replay or the ongoing of primitive cortical oscillations.

References

- Adelsberger H, Garaschuk O, Konnerth A (2005) Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci* 8:988–990.
- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes *in situ*. *J Neurosci* 22:9430–9444.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389–400.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Krnjevic K (1988) Changes in voltage dependence of NMDA currents during development. *Neurosci Lett* 94:88–92.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradietti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303–325.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87:1215–1284.
- Biagioli E, Bartalena L, Boldrini A, Pieri R, Cioni G (1999) Constantly discontinuous EEG patterns in full-term neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Clin Neurophysiol* 110:1510–1515.
- Binshtok AM, Fleidervish IA, Sprengel R, Gutnick MJ (2006) NMDA receptors in layer 4 spiny stellate cells of the mouse barrel cortex contain the NR2C subunit. *J Neurosci* 26:708–715.
- Cang J, Rentería RC, Kaneko M, Liu X, Copenhagen DR, Stryker MP (2005) Development of precise maps in visual cortex requires patterned spontaneous activity in the retina. *Neuron* 48:797–809.
- Cattani AA, Bonfardin VD, Represa A, Ben-Ari Y, Aniksztejn L (2007) Generation of slow network oscillations in the developing rat hippocampus after blockade of glutamate uptake. *J Neurophysiol* 98:2324–2336.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E, Huang ZJ (2004) Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* 24:9598–9611.
- Corlew R, Bosma MM, Moody WJ (2004) Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *J Physiol* 560:377–390.
- Craig MC, Malenka RC (1995) A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375:325–328.
- Crépel V, Aronov D, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R (2007) A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* 54:105–120.
- Dallas M, Boycott HE, Atkinson L, Miller A, Boyle JP, Pearson HA, Peers C (2007) Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *J Neurosci* 27:3946–3955.
- Dammerman RS, Flint AC, Noctor S, Kriegstein AR (2000) An excitatory GABAergic plexus in developing neocortical layer 1. *J Neurophysiol* 84:428–434.
- Demarque M, Villeneuve N, Manent JB, Becq H, Represa A, Ben-Ari Y, Aniksztejn L (2004) Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. *J Neurosci* 24:3289–3294.
- Dupont E, Hanganu IL, Kilb W, Hirsch S, Luhmann HJ (2006) Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* 439:79–83.
- Dzhala V, Desfreres L, Melyan Z, Ben-Ari Y, Khazipov R (1999) Epileptic action of caffeine during anoxia in the neonatal rat hippocampus. *Ann Neurol* 46:95–102.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11:1205–1213.
- Fleidervish IA, Binshtok AM, Gutnick MJ (1998) Functionally distinct NMDA receptors mediate horizontal connectivity within layer 4 of mouse barrel cortex. *Neuron* 21:1055–1065.
- Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17:8363–8375.
- Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A (1998) Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 507:219–236.
- Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A (2000) Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* 3:452–459.
- Hanganu IL, Ben-Ari Y, Khazipov R (2006) Retinal waves trigger spindle bursts in the neonatal rat visual cortex. *J Neurosci* 26:6728–6736.
- Hensch TK, Stryker MP (2004) Columnar architecture sculpted by GABA circuits in developing cat visual cortex. *Science* 303:1678–1681.
- Kandler K, Gillespie DC (2005) Developmental refinement of inhibitory sound-localization circuits. *Trends Neurosci* 28:290–296.
- Kandler K, Katz LC (1998) Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci* 18:1419–1427.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133–1138.
- Khazipov R, Luhmann HJ (2006) Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci* 29:414–418.
- Khazipov R, Sirota A, Leinekugel X, Holmes GL, Ben-Ari Y, Buzsáki G (2004) Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 432:758–761.
- Kidd FL, Isaac JT (2000) Glutamate transport blockade has a differential effect on AMPA and NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the developing barrel cortex. *Neuropharmacology* 39:725–732.
- Kumar SS, Huguenard JR (2003) Pathway-specific differences in subunit composition of synaptic NMDA receptors on pyramidal neurons in neocortex. *J Neurosci* 23:10074–10083.
- Lamblin MD, André M, Challamel MJ, Curzi-Dascalova L, d’Alessie AM, De Giovanni E, Moussalli-Salefranque F, Navelet Y, Plouin P, Radvanyi-Bouvet MF, Samson-Dollfus D, Vecchierini-Blineau MF (1999) [Electroencephalography of the premature and term newborn. Maturation aspects and glossary]. *Neurophysiol Clin* 29:123–219.
- Marandi N, Konnerth A, Garaschuk O (2002) Two-photon chloride imaging in neurons of brain slices. *Pflügers Arch* 445:357–365.
- McCabe AK, Chisholm SL, Picken-Bahrey HL, Moody WJ (2006) The self-regulating nature of spontaneous synchronized activity in developing mouse cortical neurones. *J Physiol* 577:155–167.
- McCabe AK, Easton CR, Lischalk JW, Moody WJ (2007) Roles of glutamate and GABA receptors in setting the developmental timing of spontaneous synchronized activity in the developing mouse cortex. *Dev Neurobiol* 67:1574–1588.
- Milh M, Becq H, Villeneuve N, Ben-Ari Y, Aniksztejn L (2007a) Inhibition of glutamate transporters results in a “suppression-burst” pattern and partial seizures in the newborn rat. *Epilepsia* 48:169–174.
- Milh M, Kamińska A, Huon C, Lapillonne A, Ben-Ari Y, Khazipov R (2007b) Rapid cortical oscillations and early motor activity in premature human neonate. *Cereb Cortex* 17:1582–1594.
- Min MY, Rusakov DA, Kullmann DM (1998) Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion. *Neuron* 21:561–570.
- Minlebaev M, Ben-Ari Y, Khazipov R (2007) Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex *in vivo*. *J Neurophysiol* 97:692–700.
- Moody WJ, Bosma MM (2005) Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* 85:883–941.
- Nevian T, Sakmann B (2004) Single spine Ca^{2+} signals evoked by coincident EPSPs and backpropagating action potentials in spiny stellate cells of layer 4 in the juvenile rat somatosensory barrel cortex. *J Neurosci* 24:1689–1699.

- Nicol X, Voyatzis S, Muzerelle A, Narboux-Nême N, Südhof TC, Miles R, Gaspar P (2007) cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. *Nat Neurosci* 10:340–347.
- Ohtahara S, Yamatogi Y (2003) Epileptic encephalopathies in early infancy with suppression-burst. *J Clin Neurophysiol* 20:398–407.
- Owens DF, Kriegstein AR (1998) Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J Neurosci* 18:5374–5388.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16:6414–6423.
- Pérez-Otaño I, Luján R, Tavalin SJ, Plomann M, Modregger J, Liu XB, Jones EG, Heinemann SF, Lo DC, Ehlers MD (2006) Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nat Neurosci* 9:611–621.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316–321.
- Sipilä ST, Huttu K, Soltesz I, Voipio J, Kaila K (2005) Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. *J Neurosci* 25:5280–5289.
- Sun JJ, Luhmann HJ (2007) Spatio-temporal dynamics of oscillatory network activity in the neonatal mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 26:1995–2004.
- Syed MM, Lee S, Zheng J, Zhou ZJ (2004) Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina. *J Physiol* 560:533–549.
- Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, Attwell D (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol* 200:401–409.
- Tolonen M, Palva JM, Andersson S, Vanhatalo S (2007) Development of the spontaneous activity transients and ongoing cortical activity in human preterm babies. *Neuroscience* 145:997–1006.
- Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R (2003) Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J Neurophysiol* 90:2964–2972.
- Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hübner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R (2006) Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* 314:1788–1792.
- Tyzio R, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R (2007) Timing of the developmental switch in GABA(A) mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings. *Epilepsia* 48 [Suppl 5]:96–105.
- Vanhatalo S, Tallgren P, Andersson S, Sainio K, Voipio J, Kaila K (2002) DC-EEG discloses prominent, very slow activity patterns during sleep in preterm infants. *Clin Neurophysiol* 113:1822–1825.
- Vanhatalo S, Palva JM, Andersson S, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2005) Slow endogenous activity transients and developmental expression of K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 in the immature human cortex. *Eur J Neurosci* 22:2799–2804.
- Vecchierini MF, André M, d'Allest AM (2007) Normal EEG of premature infants born between 24 and 30 weeks gestational age: terminology, definitions and maturation aspects. *Neurophysiol Clin* 37:311–323.
- Volterra A, Trottì D, Tromba C, Floridi S, Racagni G (1994) Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14:2924–2932.
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A (2004) Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol* 557:829–841.
- Yuste R, Katz LC (1991) Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6:333–344.
- Yuste R, Peinado A, Katz LC (1992) Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 257:665–669.
- Yuste R, Nelson DA, Rubin WW, Katz LC (1995) Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. *Neuron* 14:7–17.

Article 2
(en preparation)

**Synchronous Plateau Assemblies are a prominent morpho-physiological stage
for the development of GABAergic interneurons**

Camille Allene, Michel Picardo, Philippe Guigue, Agnès Baude, Hélène Becq, and Rosa
Cossart

Etant donné l'organisation séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée du développement (voir la partie III de l'introduction) et les multiples rôles probables de ces activités dans la maturation à la fois du réseau et des neurones qui le constituent (voir la partie IV de l'introduction), nous émettons l'hypothèse que ces patrons d'activité neuronale ne reflètent pas uniquement l'expression d'une séquence précise dans le développement des propriétés neuronales individuelles mais participent également à la maturation de ces propriétés (Ganguly et al., 2001; Lischalk et al., 2009; McCabe et al., 2006; Moody and Bosma, 2005). En d'autres termes, un patron d'activité neuronale corrélée donné pourrait directement être la cause des changements des propriétés neuronales et de l'organisation du réseau qui permettraient en retour de terminer ce patron et de démarrer le suivant. Nous avons testé l'hypothèse que le premier patron d'activité neuronale corrélée de la séquence de maturation de l'hippocampe et du néocortex, le SPA, jouait un tel rôle.

La transmission GABAergique étant centrale pour la genèse des GDPs (Ben Ari et al., 1989; Bonifazi et al., 2009; Garaschuk et al., 1998; Sipila et al., 2005), nous avons directement analysé le rôle de l'activité SPA pour la maturation des interneurones GABAergiques.

Matériel et Méthodes :

I. Préparation des tranches d'hippocampe et de néocortex et imagerie calcium.

Des tranches coronales et horizontales de cortex somatosensoriel et des tranches transversales d'hippocampe (380-450µm) sont préparées à partir de rat Wistar ou de souris Knock in GAD67 GFP agés de 20 jours embryonnaires (E20) à 9 jours postnataux (P9) en utilisant un vibratome rempli de liquide céphalo-rachidien artificiel (ACSF pour Artificial Cerebro-Spinal Fluid) modifié et oxygéné (mACSF: 0.5 mM CaCl₂ et 7 mM MgSO₄; NaCl remplacé par une concentration équimolaire de choline). Les tranches sont ensuite transférées dans l'ACSF normal et oxygéné pour un repos d'environ 1 heure. (ACSF, en mM: 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1.3 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, et 10 D-glucose), pH 7.4. Pour charger les cellules en fluorophore, les tranches sont incubées dans une petite fiole contenant 2.5 ml d'ACSF oxygéné avec 25 µl d'une solution d'1mM de fura-2 AM (Molecular Probes ; dans 100% de DMSO) pendant 20 à 30 min. Les tranches sont ensuite incubées dans l'obscurité et la solution d'incubation est maintenue à 35°-37°C. Les tranches sont perfusées à 4 ml/min avec un ACSF normal continuellement oxygéné (95% O₂ / 5% CO₂). L'imagerie est effectuée avec un système de balayage laser bi-photons multifaisceaux (Trimscope-LaVision Biotec) couplé à un microscope Olympus. Les images sont acquises via une caméra CCD (La Vision Imager 3QE), avec une résolution temporelle d'environ 100 ms (2 x 2 binning, taille d'un pixel: 600 nm). Les images des tranches sont acquises en utilisant un objectif à large ouverture numérique et

faible grossissement (NA 0.95, x20, Olympus). La taille du champ imité est généralement 430 x 380 µm². La profondeur de l'imagerie est en moyenne de 80 µm sous la surface (50-100 µm)

2. Préparation des tranches d'hippocampe en culture organotypique et imagerie calcium.

Les tranches organotypiques sont préparées à partir d'hippocampe de souris Knock in GAD67 GFP à P4, selon la procédure décrite par (Stoppini et al., 1991) avec quelques changements mineurs. Brièvement, les souris sont décapitées sous anesthésie avec de l'hydrate de chloral (i.p., 350 mg/kg). Après avoir retiré le cerveau, des sections d'hippocampe de 400 µm d'épaisseur sont préparées en utilisant un chopper (Mc Ilwain, U.S.A.) et collectées dans une solution de PBS complétée avec 0.5% de D-glucose. Les tranches sont ensuite gardées à 4°C pendant 30 min dans le PBS-glucose puis placées sur des membranes de culture Millicell-CM (0.4 µm; Millipore). Ces membranes sont ensuite placées dans des plaques de cultures avec 1 ml de milieu de culture (MEM, sigma) complété avec : glucose (25 mM), HEPES (30 mM), Na₂CO₃.H₂O (5 mM), L-glutamine (3 mM), acide L-ascorbique (0.5 mM), CaCl₂ (2 mM), MgSO₄ (2.5 mM), insuline 1 mg/L, rouge de phénol (2 mL/L of 0.5% solution), pH 7.25–7.29, et du sérum de cheval (20%; Sigma). Les tranches sont ensuite maintenues pendant 2 jours dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère contenant 5% de CO₂. Le deuxième et le troisième jours suivant leur préparation, nous effectuons l'imagerie. Au cours de toute la période expérimentale, les tranches sont laissées dans leur plaque de culture initiale avec le milieu de culture. Pour charger les cellules en fluorophore, nous appliquons sur les tranches 1 ml d'ACSF, identique à celui utilisé pour les tranches aigues, mais précédemment filtré, puis 2 µl d'1 mM de solution de fura-2 AM (Molecular Probes; dans 100% de DMSO) pendant 20 à 30 min, dans l'incubateur. Avant d'effectuer l'imagerie calcium nous ajoutons 1 ml d'ACSF filtré au dessus de la tranche, qui est retiré juste après l'imagerie. Pour l'expérience pharmacologique nous ajoutons 1 µl de Bumetanide (10 mM, Sigma) dans 1 ml d'ACSF filtré au dessus de la tranche, puis nous laissons la plaque de culture dans l'incubateur pendant 15 min avant l'imagerie. Afin d'éviter la contamination des cultures, chaque plaque de culture contenant les tranches est manipulée sous une atmosphère stérile (pour les protocoles de chargement en fluorophore et d'incubation de bumetanide). Aussi, juste avant d'effectuer l'imagerie, l'objectif du microscope bi-photonique est désinfecté.

3. L'analyse.

L'analyse de l'activité calcium est effectuée avec un logiciel écrit sous Matlab (MathWorks). Ce programme identifie automatiquement les cellules chargées de fluorophore et mesure leur fluorescence en fonction du temps. Le signal calcique de chaque cellule est la fluorescence moyenne à l'intérieur du contour de la cellule, mesuré en fonction du temps. Les algorithmes de traitement du signal du logiciel MiniAnalysis (Synaptosoft) ont été utilisés pour détecter le début et la fin (temps à la mi-amplitude du retour) des signaux calciques dans les traces des cellules individuelles. Les cellules

actives sont celles qui présentent au moins un évènement calcium au cours de la période d'enregistrement. La fréquence d'une activité de réseau est l'intervalle de temps moyen entre deux pics de synchronisation. L'amplitude d'une activité de réseau est la moyenne du nombre maximum de cellules co-actives à chaque pic de synchronisation. Pour identifier les pics de synchronisation significatifs, i.e. qui incluent plus de cellules co-actives que les pics obtenus par hasard, nous utilisons une fonction matlab qui réordonne aléatoirement les intervalles entre les évènements de chaque cellule pour créer une série de séquence aléatoire d'évènements. Cette action est effectuée 1000 fois par film et le seuil de significativité (correspondant à $p < 0.05$) est estimé par le nombre de cellules co-actives au sein d'une seule image lorsque ce nombre est atteint dans au moins 5 % des histogrammes issus du remaniement. Les valeurs expérimentales sont données par les moyennes \pm l'erreur type des moyennes (SEMs pour Standard Error of the Means). Le test t de student et le test de Mann-Whitney sont utilisés pour les comparaisons statistiques des moyennes. La probabilité $p < 0.05$ est considérée comme significative. La procédure entière peut-être effectuée en direct suffisamment rapidement pour identifier les cellules à cibler pour les enregistrements électrophysiologiques.

L'analyse des expériences organotypiques présente une difficulté ; celle de trouver la nouvelle position de chaque cellule le second jour d'expérimentation. En effet, les cellules se déplacent d'un jour à l'autre principalement parce que les tranches continuent de s'aplatir au fond de la plaque de culture. Généralement, trois points focaux différents sont nécessaires le second jour pour retrouver toutes les cellules filmées le premier jour. Pour trouver la correspondance de chaque cellule au sein d'un réseau donné d'un jour à l'autre, nous prenons grand soin d'orienter les tranches sous l'objectif du microscope bi-photonique, de la même manière chaque jour. Puis, nous utilisons l'architecture grossière de l'hippocampe pour trouver le réseau d'intérêt, généralement nous centrons le champ à filmer au niveau du début de la région CA3c. Finalement, nous utilisons des indices visuels facilement reconnaissables tels que des cellules de formes particulières, des groupes de cellules dessinant un motif, ou le réseau de cellules GAD67 GFP ou encore des artefacts.

4. L'electrophysiologie.

Les neurones sont enregistrés en utilisant la technique du patch clamp en configuration cellule entière. Pour le mode voltage imposé, la composition de la solution intracellulaire est : 120 mM Cs-gluconate, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM Na₂ adenosine triphosphate, 10 mM HEPES. Avec cette solution, les courants post-synaptiques transmis par les récepteurs glutamatergiques (EPSCs) s'inversent à +10 mV alors que les courants post-synaptiques transmis par les récepteurs GABA_A (IPSCs) s'inversent à +60 mV. Les courants post-synaptiques GABA et AMPA miniatures (mIPSCs et mEPSCs respectivement) sont collectés en présence de TTX (1 µM, Tocris) au potentiel de maintient de +10 mV pour les mIPSCs et de -60 mV pour les EPSCs. Pour le mode

courant imposé la composition de la solution intracellulaire est : 130 mM K-methylSO₄, 5 mM KCl, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM Mg-ATP, et 0.3 mM GTP. Aucune correction du potentiel de jonction liquide n'a été appliquée. L'osmolarité est de 265-275 mOsm, PH 7.3. La résistance des microélectrodes est de 4-8 MΩ. La résistance d'accès non compensée est enregistrée au cours de l'enregistrement. Les valeurs <20 MΩ sont considérées comme acceptables et les résultats sont écartés si le changement est supérieur à 20%. Les mesures en configuration cellule entière sont filtrées à 3 kHz en utilisant l'amplificateur HEKA, EPC10. Les enregistrements sont numérisés en direct (20 kHz) avec une carte interface Labmaster à un ordinateur personnel et sont acquis avec un logiciel Axoscope 7.0 (Molecular Devices). La synchronisation entre les signaux optiques et électriques est permise en alimentant simultanément la carte interface Labmaster avec le déclenchement du signal de chaque image du film et les enregistrements électrophysiologiques. Les enregistrements électrophysiologiques sont analysés en utilisant le logiciel MiniAnalysis (Synaptosoft).

Résultats

L'évolution des cellules SPA au cours de la maturation postnatale du réseau hippocampique

Avant de démarrer ce travail de thèse, notre équipe avait montré que le déclin développemental du SPA, qui débutait vers P0-2, était clairement anti corrélé avec l'expansion progressive des GDPs qui culminait à P6-10, au sein de l'hippocampe de souris (Crepel et al., 2007). Etant donné qu'il existe une mort cellulaire programmée physiologique à ce stade du développement postnatal (Buss and Oppenheim, 2004; Raff et al., 1993), les SPAs pourraient être un patron exprimé sélectivement au sein d'une population neuronale transitoire, ou alternativement ils peuvent représenter une étape transitoire de la maturation neuronale. Pour répondre à cette question, nous avons effectué l'imagerie calcium multi-neurones au niveau de la région CA3 de tranches d'hippocampe organotypiques, afin de suivre quotidiennement les mêmes populations neuronales. Nous avons spécialement conçu une procédure expérimentale pour éviter les contaminations des cultures par l'imagerie répétitive (voir la partie Méthode). Les cultures de tranches organotypiques sont préparées à partir d'hippocampes de rats âgés de 4 jours (P4) et sont enregistrées à partir du deuxième jour après leur mise en culture, grâce au microscope bi-photon multifaisceaux. Ainsi, le premier jour (J) d'enregistrement correspond à P6 et le jour d'après (J+1) correspond à P7. Afin de valider les cultures de tranches organotypiques en tant que modèle pour l'étude de la maturation des patrons d'activité neuronale de la

première semaine de vie postnatale, nous avons comparé les patrons d'activité neuronale des tranches organotypiques avec ceux des tranches aigues. En accord avec de précédentes observations (Gahwiler et al., 1997;Holopainen, 2005), la structure de l'hippocampe, organisée en couches, et plus généralement les grandes caractéristiques de l'organisation morphologique des tranches d'hippocampe sont préservées dans les cultures organotypiques (Figure 1A). Plus important encore, les patrons d'activité neuronale corrélée sont similaires à ceux décrits précédemment au sein des tranches d'hippocampe aigues (Crepel et al., 2007). En effet, nous avons enregistré, au sein de chaque tranche organotypique ($n=4$), un patron d'activité neuronale comparable aux GDPs (Ben Ari et al., 1989;Crepel et al., 2007;Garaschuk et al., 1998) en terme de dynamique des activités calcium et des caractéristiques pharmacologiques : ce patron consiste en des événements calciques contenus dans une seule image (i.e., < 100 ms) (Crepel et al., 2007) et est dépendant de l'action excitatrice du GABA puisqu'il est bloqué par l'antagoniste sélectif de NKCC1, transporteur important le chlore vers le milieu intracellulaire, le bumetanide (en bumetanide 10 μ M, fréquence des GDPs: 11+/-11% du contrôle et amplitude: 20+/-20% du contrôle $n=5$, $p<0.05$). Les plateaux calciques correspondants aux SPAs sont aussi enregistrés au sein des tranches organotypiques. Notons que la fréquence moyenne des GDPs des tranches organotypiques est plus basse que celle mesurée dans les tranches aigues (0.04+/-0.01 Hz vs 0.08+/-0.01 Hz). La proportion de cellules actives produisant des SPAs au sein des tranches organotypiques à P6 est significativement plus grande que celle des tranches aigues au même stade (respectivement, 27+/-6 % et 12.6+/-2.3 %). Etant donné que les SPAs et les GDPs s'excluent mutuellement (Crepel et al., 2007), cette donnée est cohérente avec celle qui concerne la différence de fréquence des GDPs (voir ci-dessus). Ainsi, excepté pour la fréquence des GDPs, l'aspect général et les patrons d'activité neuronale sont similaires au sein des tranches organotypiques et aigues d'hippocampe. Nous pouvons conclure que les tranches organotypiques d'hippocampe sont un modèle valable pour l'étude de la mise en place séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée au cours du développement de l'hippocampe. Nous avons ensuite focalisé notre analyse sur le devenir individuel des cellules SPA. Nous avons trouvé que la majorité d'entre elles intègrent le réseau synaptique. En effet, elles arrêtent de produire les plateaux calciques associés au SPA et participent aux GDPs en quelques heures (environ 1 jour) : la part des cellules SPA qui sont impliquées dans les GDPs augmente graduellement alors que la part des cellules SPA produisant toujours des plateaux calciques diminue (respectivement de 56+/-5 % et de 11+/-1 % entre J et J+1, ($n=4$ tranches),

Figure 1 B&C). Inversement, la majorité des cellules GDP à J restent impliquées dans les GDPs à J+1 (67+/-11 % entre J et J+1, (n=4 tranches)). On peut conclure que les cellules impliquées dans les patrons SPA et GDP ne sont pas des populations de cellules distinctes mais plutôt que le devenir de la majorité des cellules SPA est de participer aux GDPs au cours de la maturation du réseau.

Certaines cellules SPA déclenchent un programme de mort cellulaire programmée

Il est important de noter que le reste de la population des cellules SPA qui ne sont pas intégrées dans les GDPs tout en ne produisant plus de SPAs entre J et J+1, se distribuent comme suit : environ 20% (21+/-6 %, n=4 tranches) deviennent silencieuses et environ 12% semblent disparaître (12+/-1 %, n=4 tranches), i.e. que nous ne sommes plus en mesure de les retrouver à J+1. Concernant la population des cellules GDP, environ 17% deviennent silencieuses à J+1 (17+/-5 %, n=4 tranches) et seulement 5% n'ont pas été retrouvées (5+/-8 %, n=4 tranches). Le pourcentage de cellules SPA disparaissant est donc plus de deux fois plus grand que celui des cellules GDP. Bien que nous ayons montré que les SPAs n'appartenaient pas à une population neuronale transitoire puisque la majorité d'entre elles intègrent les GDP, on ne peut pas exclure qu'une partie des cellules SPA déclenchent une mort neuronale programmée, caractéristique de cette période du développement (Buss and Oppenheim, 2004;Raff et al., 1993). De plus, selon la théorie neurotrophique (Banks et al., 2005;Buss et al., 2006;Davies, 2003;Galli-Resta and Resta, 1992;Linden, 1994;Oppenheim et al., 1991;Posada and Clarke, 1999;Sendtner et al., 2000), un neurone qui intègre le réseau cortical en développement développe une activité électrique stable qui lui permet d'être renforcé via un apport de facteurs trophiques, alors que les neurones qui échouent à intégrer le réseau n'auraient pas un niveau d'activité suffisant pour être renforcé par les facteurs trophiques et seraient alors éliminés par une mort programmée ou « apoptose ». Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que les cellules SPA qui semblent avoir disparu, pourraient avoir été éliminées par apoptose suite à un échec d'intégration du réseau synaptique des GDPs. Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué l'imagerie calcium au sein de tranches aigues d'hippocampe et de néocortex de rat entre P0 et P4, afin d'obtenir en imagerie la cartographie des cellules SPA sur une population définie de neurones. Ensuite, nous avons effectué un immuno-marquage de la forme clivée de la caspase 3, une molécule clé dans l'induction de l'apoptose (Lakhani et al., 2006;Wang, 2000). Nous quantifions la part

des cellules SPA exprimant la forme clivée de la caspase 3 en superposant la cartographie des cellules SPA, obtenue par imagerie calcium, avec la cartographie des cellules caspase 3 positives, obtenue par imagerie confocale des mêmes tranches immuno-marquées. Cette analyse est en cours mais nos résultats préliminaires indiquent que, bien que la majorité des cellules SPA ne soit pas caspase 3 positive, quelques unes d'entre elles se superposent parfaitement avec le marquage caspase 3 (figure 2). Ces cellules SPAs ont la propriété de présenter de longs plateaux calciques (Figure 2). Par ailleurs, nous n'avons observé aucune cellule participant aux GDPs qui soit caspase 3 positive. En plus des cellules SPA, nous avons observé une cellule silencieuse, *i.e.* inactive en imagerie calcium, positive pour la caspase 3. Ainsi, un signal de mort cellulaire programmée semble s'exprimer spécifiquement au sein d'une minorité de cellules SPA. Ce résultat doit être confirmé par des expériences supplémentaires.

Les interneurones GABAergiques sont impliqués dans les SPAs

Si le stade SPA est critique pour le développement des GDPs dépendants de la transmission GABAergique (Ben Ari et al., 1989; Crepel et al., 2007; Rheims et al., 2008a), il est probable que les interneurones gabaergiques participent aux assemblées de neurones SPAs. Afin d'examiner l'implication des neurones GABAergiques dans les SPAs, nous avons quantifié la proportion d'interneurones produisant des plateaux calciques en utilisant les souris knock-in GAD67-GFP (Tamamaki et al., 2003) dans lesquelles les cellules GABAergiques sont marquées à la GFP. Nous avons enregistré en imagerie calcium la région CA3 de l'hippocampe à P0-3 en présence de bloqueurs de la transmission synaptique ($10\mu\text{M}$ bicuculline, $10 \mu\text{M}$ NBQX, $40\mu\text{M}$ D-APV) pour isoler les cellules générant les plateaux calciques indépendamment de la transmission synaptique. La carte des contours correspondant aux neurones positifs pour la GFP est superposée à celle de l'imagerie calcique (figure 3A).

Nous avons plusieurs fois observé que des groupes de cellules SPAs correspondaient aux cellules GFP (au maximum 68% des cellules SPA sont GFP+ et en moyenne 22+/-37 % des cellules SPA sont GFP+; $n=14$ tranches, Figure 3A). Les enregistrements en patch clamp ciblés sur les cellules SPA GFP+ confirment que les interneurones produisent des oscillations du potentiel membranaire caractéristiques des cellules SPAs. De plus, dans quelques cas, nous avons observé un marquage à la neurobiotine au sein de deux interneurones voisins ainsi que la présence de spikelets en plus des oscillations du potentiel membranaire, dans

l'enregistrement électrophysiologique d'un des deux interneurones (figure 3B). Ces données indiquent l'existence d'un couplage direct par jonction gap entre deux interneurones SPAs. Ainsi, les neurones GABAergiques sont impliqués dans les SPAs.

Les interneurones GABAergiques impliqués dans les SPAs présentent des caractéristiques morpho-physiologiques plus immatures que les interneurones participant aux GDPs.

Etant donné que la transmission GABAergique est primordiale pour la genèse des GDPs (Ben Ari et al., 1989; Bonifazi et al., 2009; Crepel et al., 2007; Rheims et al., 2008a), nous avons émis l'hypothèse que la transition entre les patrons d'activité SPAs et GDPs pourrait avoir lieu en parallèle aux changements des propriétés morpho-physiologiques des interneurones GABAergiques. Pour tester cette hypothèse, nous avons ciblé grâce à l'imagerie calcium, des interneurones SPA et GDP pour les enregistrer en mode courant et voltage imposés afin de caractériser leurs propriétés électrophysiologiques intrinsèques et synaptiques. Les cellules sont également remplies avec de la neurobiotine au cours de l'enregistrement puis traitées avec un protocole immunohistochimique spécifique afin de révéler leur morphologie. Comme attendu (Crepel et al., 2007), en mode courant imposé au potentiel membranaire de repos (V_{rest}), les interneurones SPAs présentent des oscillations membranaires récurrentes qui ne sont pas affectées par le blocage de la transmission synaptique via l'utilisation d'antagonistes des récepteurs GABA_A, AMPA et NMDA (10 µM bicuculline, 10 µM NBQX, 40 µM D-APV, n=14 cellules, figure 4A1). Notons que la plupart des interneurones GDPs sont aussi spontanément actifs au potentiel de repos en présence des bloqueurs synaptiques mais, contrairement aux interneurones SPA, émettent des potentiels d'action de façon tonique (figure 4A2). Nous avons aussi examiné les patrons de décharge des interneurones en réponse à des créneaux de courant dépolarisant. Nous montrons que tous les interneurones SPA présentent un patron d'activité fortement adaptatif (n=9, figure 4B1) alors que les interneurones GDP présentent une variété de patrons de décharge pouvant être classifiés selon la terminologie Petilla (Ascoli et al., 2008) comme patron de décharge à potentiels d'action rapides (n=12 cellules, figure 4B2), patron non-adaptatif (n=2 cellules), patron adaptatif (n=4 cellules), patron à potentiels d'action irréguliers (n=2 cellules) ou patron saccadé « stuttering » (n=1 cellule). De plus, le potentiel membranaire de repos (V_{rest}) ainsi que l'amplitude et la durée des potentiels d'action (AP) sont significativement différents entre les interneurones SPAs et GDPs : les cellules SPAs présentent un potentiel

de repos plus dépolarisé et des potentiels d'action d'amplitude plus courte et de durée plus longue que ceux des interneurones GDPs (table 1). Toutes ces caractéristiques indiquent un stade de développement physiologique plutôt immature des cellules SPA (Ahuja and Wu, 2000;Belleau and Warren, 2000;Doischer et al., 2008;Kasper et al., 1994;McCormick and Prince, 1987;Okaty et al., 2009;Spigelman et al., 1992;Zhang, 2004). En revanche, la résistance membranaire (R_m) et la capacitance (C_m) des interneurones SPA et GDP ne sont pas significativement différentes (table 1). Le fait que la capacitance ne soit pas significativement différente entre les deux types d'interneurones peut sembler surprenant, puisque, la capacitance permet habituellement de quantifier de manière indirecte la surface cellulaire (Chitwood et al., 1999;Major et al., 1994;Thurbon et al., 1998), elle devrait séparer les populations cellulaires distinctes. Cependant, il est possible que le groupe des interneurones GDP que nous avons étudié contienne différents types d'interneurones comme l'atteste la grande variété de patron de décharge décrite plus haut. Nous avons ensuite enregistré les courants postsynaptiques excitateurs et inhibiteurs spontanés et miniatures (respectivement : sEPSC/sIPSCs et mEPSC/mIPSCs). Dans nos conditions les mIPSCs sont mesurés à l'inversion des courants glutamatergiques et les mEPSCs à l'inversion des courants GABAergiques afin d'isoler les composantes GABAergiques et glutamatergiques en l'absence de bloquant pharmacologique. Nous observons que l'amplitude moyenne des événements reçus par les interneurones SPA était significativement plus grande que celle des événements reçus par les interneurones GDP (voir la table 2 et la figure 5). Les histogrammes de la distribution des amplitudes des mIPSCs et des mEPSCs des interneurones SPA et GDP sont unimodaux et excepté la distribution des mEPSCs des cellules GDPs, la distribution des mPSCs présente un biais vers la droite, *i.e.* vers les événements de large amplitude et présente également un grand écart-type (SD pour « standard deviation ») (SD= 33.7 et 21 pour les mIPSCs respectivement des cellules SPA et GDP et 27 et 6.5, pour les mEPSCs des cellules SPA et GDP, table 2 et figure 5). Cependant, bien que la tendance de la distribution de l'amplitude des mIPSCs soit la même pour les interneurones SPA et GDP, *i.e.* un biais vers la droite et un grand écart type, elle est plus accentuée pour les interneurones SPA. Nous pouvons conclure que lorsque les interneurones GABAergiques sont dans le stade du SPA, ils reçoivent des courants synaptiques d'amplitude plus variable avec une amplitude moyenne significativement plus élevée que les interneurones GDP.

Enfin, les reconstructions pour l'analyse morphométrique des interneurones SPA et GDP sont en cours. Toutefois, nous pouvons noter que les interneurones SPA présentent une caractéristique morphologique remarquable puisqu'ils possèdent de nombreuses excroissances fines, ressemblant à des filopodes, sur leur soma alors que le soma des interneurones GDP est généralement lisse et possède plus de départs de troncs dendritiques que le soma des cellules SPA (figure 4 et table 3). Concernant l'axone des interneurones SPA, nous observons : soit un axone relativement long, soit nous ne pouvons l'identifier. Concernant l'axone des interneurones GDP, leur morphologie, à l'image de leurs patrons de décharges, est variable. On note toutefois une plus grande occurrence de la morphologie axonale de cellules en panier. Cependant il reste à les reconstruire pour ensuite les quantifier.

Pour conclure, il semble que les interneurones GABAergiques soient capable de modifier complètement leur propriétés morpho-physiologiques à l'échelle de quelques heures (1 jour environ) au moment de l'émergence des GDPs.

Discussion

Au cours de cette étude, nous examinons le devenir des cellules impliquées dans le premier patron d'activité neuronale cordonnée (SPAs) au cours du développement des réseaux. Nous montrons que le devenir principal des cellules SPA est d'intégrer un réseau plus mature représenté par les GDPs. Cette évolution s'accompagne de la disparition de propriétés morpho-physiologiques spécifiques au sein de la population des interneurones GABAergiques. Ces résultats apportent des preuves directes de l'existence d'une corrélation entre la maturation du réseau et celle des neurones individuels qui le constituent et montrent en particulier comment de profonds changements développementaux concernant les propriétés morpho-physiologiques des interneurones GABAergiques annoncent l'émergence des GDPs.

I. Les cellules SPAs intègrent le réseau synaptique et participent aux GDPs

Jusqu'à présent, les deux études ayant décrit la maturation séquentielle des patrons SPA et GDP au cours de la première semaine postnatale chez le rongeur, ont utilisé la préparation en tranches aigues (Allene et al., 2008; Crepel et al., 2007), qui fournit seulement des instantanés du réseau en développement. Il était donc impossible de conclure si les mêmes populations étaient impliquées séquentiellement dans les SPA puis dans les GDPs. Nous

avons développé une approche utilisant les tranches organotypiques pour suivre le devenir individuel des cellules impliquées dans les SPAs en fonction de la maturation de réseau. Avec cette approche, nous montrons que la majorité des cellules SPAs intègrent les GDPs à l'échelle de quelques heures. En parallèle nous avons observé que la majorité des cellules GDPs restent impliquées dans les GDPs le jour suivant. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes décrivant le profil développemental de la séquence de maturation, dans lequel le déclin de l'activité SPA démarre lorsque les GDPs commencent à apparaître dans le réseau (Allene et al., 2008;Crepel et al., 2007). La différence majeure entre les tranches organotypiques et les tranches aigues d'hippocampe concerne la fréquence des GDPs, plus grande au sein des tranches organotypiques. Cette différente s'explique probablement par un phénomène de plasticité, qui prend place au cours de la période de culture, en tant que mécanisme de compensation en réponse à la section des projections axonales qui survient inévitablement au cours de la procédure de préparation des tranches (Adcock et al., 2004;De et al., 2003;Fenili and De, 2003;Lossi et al., 2009). En effet, des études ont montré que cette plasticité concerne le patron d'arborisation dendritique, qui apparaît plus complexe au sein des tranches organotypiques d'hippocampe et de cervelet qu'au sein de leurs équivalentes aigues (Adcock et al., 2004;De et al., 2003;Fenili and De, 2003). De plus, Edwards et collaborateurs ont montré une augmentation significative de la fréquence des courants miniatures glutamatergiques au sein des tranches organotypiques d'hippocampe (De Simoni et al., 2003). Au sein des tranches aigues, une telle plasticité est probablement plus faible puisqu'elles sont utilisées dans les heures qui suivent leur préparation. Cette plasticité n'interfère probablement pas avec notre analyse puisque nous observons toujours les deux principaux patrons d'activité neuronale corrélée: les SPAs et les GDPs au sein des tranches organotypiques d'hippocampe, initialement décrits au sein de tranches aigues (Ben-Ari et al., 1989; Garashuck et al., 1998; Allene et al., 2008; Crepel et al., 2007; Rheims et al., 2008).

Ainsi, les résultats révélés par nos tranches organotypiques, concernant le devenir principal des neurones au cours du développement périnatal, qui est l'intégration pour les cellules SPA et la stabilité pour les cellules GDPs au sein du réseau synaptique, semblent être pertinents et spécifiques du développement.

Puisque les GDPs synchronisent un large réseau de cellules au sein de l'hippocampe (Crepel et al., 2007), il est probable que toutes les cellules du réseau participent aux GDPs à un moment donné de leurs étapes développementales (Ben-Ari et al., 2007;Pfeffer et al., 2009).

Au contraire, l'activité SPA est moins massive et plus locale (Allene et al., 2008;Crepel et al., 2007), il est donc difficile de savoir si toutes les cellules passeront par ce stade. On ne peut pas encore exclure que les SPAs ne soient exprimés que par des sous-familles restreintes d'interneurones. Pour conclure que le SPA est un stade universel et nécessaire pour la maturation de tout type de cellule corticale, le devenir des cellules SPA devra être examiné sur le long terme et nécessitera des approches différentes telles que la technique de cartographie génétique du devenir des cellules ou «fate mapping» en anglais (Batista-Brito and Fishell, 2009;Miyoshi and Fishell, 2006).

2. Les interneurones SPA présentent des propriétés morpho-physiologiques immatures

D'après les propriétés morpho-physiologiques des cellules SPA, il semble que les cellules SPA soient plus immatures que les cellules GDPs : i) les caractéristiques morpho-physiologiques spécifiques des cellules SPAs existent puis disparaissent avant celles des cellules GDPs au cours du développement périnatal, ii) les potentiels d'action, avec leur petite amplitude et leur longue durée et les patrons de décharge fortement adaptatif des cellules SPA semblent être un signe supplémentaire de l'immaturité de ces cellules (Ahuja and Wu, 2000;Belleau and Warren, 2000;Doischer et al., 2008;Kasper et al., 1994;McCormick and Prince, 1987;Okaty et al., 2009;Spigelman et al., 1992;Zhang, 2004) iii) le ratio entre le nombre de filopodes somatique et le nombre de troncs dendritiques, est plus élevé pour les cellules SPA que pour les cellules GDP. Or, il a été montré que les filopodes, dont les filopodes somatiques, seraient les précurseurs des dendrites (Portera-Cailliau and Yuste, 2001;Portera-Cailliau et al., 2003;Sotelo and Dusart, 2009;Vaughn, 1989). La plus grande occurrence de courants postsynaptiques miniatures géants est-elle aussi un signe de l'immaturité des interneurones SPA ? Cette caractéristique est plus difficile à interpréter. Nous avions supposé que les cellules SPAs pourraient avoir des courants postsynaptiques miniatures GABA spécifiques puisqu'elles intègrent les GDPs transmis par les signaux GABAergiques en quelques heures. Nous avons donc été surpris de constater que les courants postsynaptiques miniatures AMPA présentaient la même caractéristique que les GABA, i.e., la présence de courants miniatures d'amplitude géante et un fort biais vers la droite de leur distribution. Plusieurs interprétations pourraient expliquer de telles grandes amplitudes et leur biais dans la distribution. Il est par exemple possible que l'influx massif de calcium associé à un événement SPA entraîne la libération d'un messager rétrograde augmentant la probabilité de libération de neurotransmetteur (NO, CCK, GABA, etc..).

Cette hypothèse est peu probable étant donné que les courants synaptiques enregistrés dans cette étude ont été mesurés en conditions de voltage-imposé, une condition expérimentale qui devrait bloquer les plateaux calciques eux-mêmes voltage-dépendants. Deuxièmement, les mPSCs des interneurones SPA pourraient provenir de sous-populations synaptiques distinctes ayant des propriétés présynaptiques ou postsynaptiques uniques. Pour tester ces possibilités, la relation entre les amplitudes et la constante de temps du déclin des mPSCs individuels pour chaque cellule SPA doit être examinée. Si les événements proviennent de différentes classes de synapses ayant des propriétés uniques, l'organisation des événements dans la distribution devrait présenter autant de clusters que de sous-populations synaptiques. Enfin, certains événements pourraient être générés sur des sites synaptiques plus proches du soma que les sites synaptiques sur lesquelles les autres événements sont générés, évitant ainsi leur atténuation électrotonique. Cette seconde hypothèse semble la plus probable puisque : i) les amplitudes et leur distribution, spécifiques des mPSCs des cellules SPA, concernent à la fois les mPSCs GABA et AMPA, or, la probabilité que deux types de synapses indépendants telles que les synapses GABA et AMPA, se divisent en sous-populations synaptiques aux propriétés uniques, de manière similaire semble peu probable. ii) Le nombre de filopodes somatiques, plus grand que le nombre de troncs dendritiques pour les cellules SPA, représente une condition idéale pour limiter l'atténuation électrotonique de n'importe quel courant arrivant sur de telles protrusions somatiques et donc favorise les événements de grande amplitude. Des études précédentes ont montré que l'activation des canaux calcium de type L induisent l'activation du facteur CREB qui est impliqué dans la croissance dendritique (Neal et al., 2010;Redmond and Ghosh, 2005;Wong and Ghosh, 2002). Or, l'activité SPA est caractérisée par une entrée massive de calcium au sein des cellules SPA, via les canaux calcium de type L, indépendante de la transmission synaptique (Crepel et al., 2007). Donc l'activité intrinsèque de l'activité SPA pourrait favoriser les filopodes somatiques. Comme nous l'avions suggéré plus haut, les filopodes créent des conditions morphologiques idéales pour recevoir des courants miniatures géants et selon notre hypothèse initiale de la boucle de rétrocontrôle, les courants miniatures géants pourraient favoriser en retour la fin des filopodes en permettant leur transformation en tronc dendritique. Plusieurs études ont montré que les événements miniatures jouent d'importants rôles tels que la régulation des décharges postsynaptiques ou l'homéostasie des synapses et des épines dendritiques (Carter and Regehr, 2000;Frank et al., 2006;McKinney et al., 1999). Les courants miniatures géants de cette étude pourraient aussi permettre la

maturation des propriétés électrophysiologiques des cellules, nécessaire pour leur intégration au sein du réseau synaptique des GDPs et dont l'échec conduirait à leur mort cellulaire programmée. Cependant, l'apoptose des cellules SPAs étant un résultat préliminaire, il sera discuté uniquement dans la partie discussion générale de ce manuscrit, ci-après.

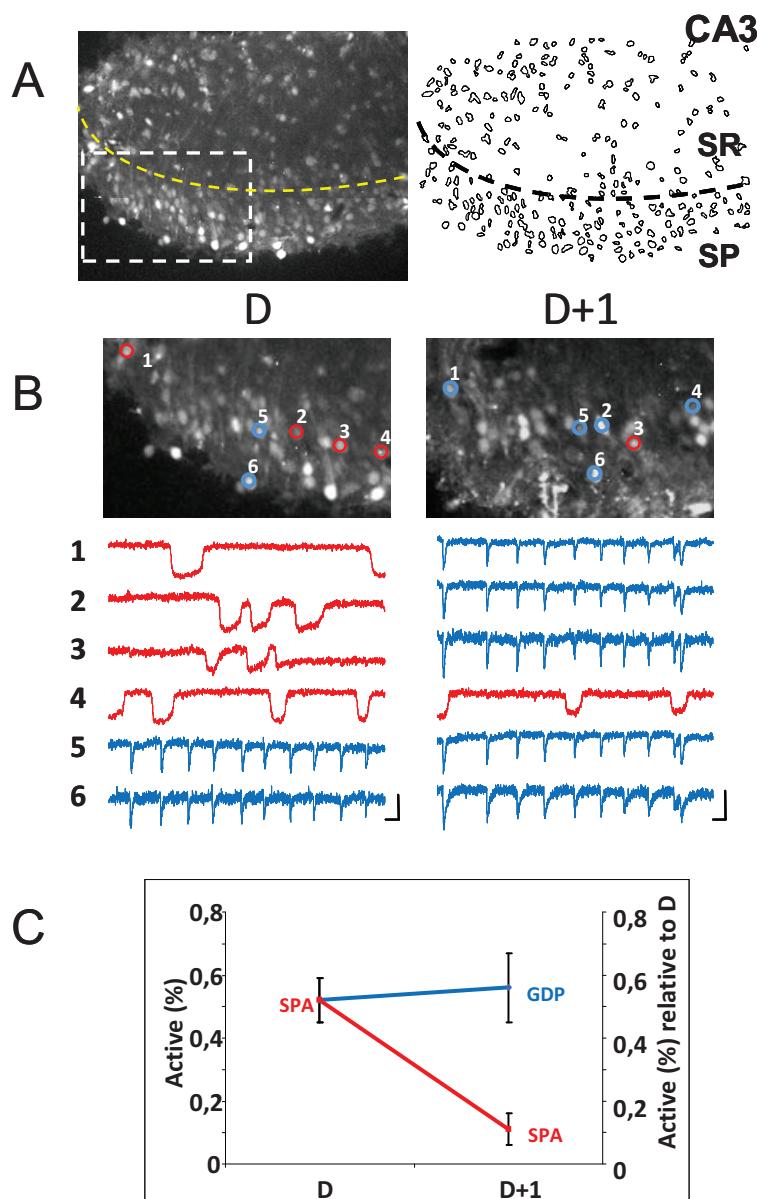


Figure 1: Les cellules SPA intègrent le réseau synaptique sous-tendant la genèse des GDPs.

A. L'image de la fluorescence calcium obtenue par microscopie bi-photon et la carte des contours cellulaires correspondante de la région CA3 d'une tranche organotypique d'hippocampe de souris à P4. Notons que l'organisation morphologique des tranches d'hippocampe est bien préservée au sein des tranches organotypiques. B. Une partie de la zone imagede en (A), représentée à plus fort grossissement, est enregistrée à P6 (D) et P7 (D+1), les contours en rouge indiquent 4 cellules SPA et les contours en bleu indiquent 2 cellules GDP, la numérotation désigne les mêmes cellules entre D et D+1 (voir la partie Méthode). Au dessous sont représentés les tracés de fluorescence calcium respectifs en fonction du temps. Barre d'échelle: 10 sec, 20%DF/F. C. Diagramme indiquant la proportion moyenne de cellules actives impliquées dans les SPAs au jour D et la proportion de cellules SPA à D impliquées dans les GDPs à D+1, ($n= 4$ tranches). Notons que le pourcentage des cellules SPA à D impliquées dans les GDPs le jour d'après est plus grand que celui des cellules SPA produisant toujours des SPAs à D+1 ($0.56\% +/- 0.05$ vs $0.11\% +/- 0.1$)

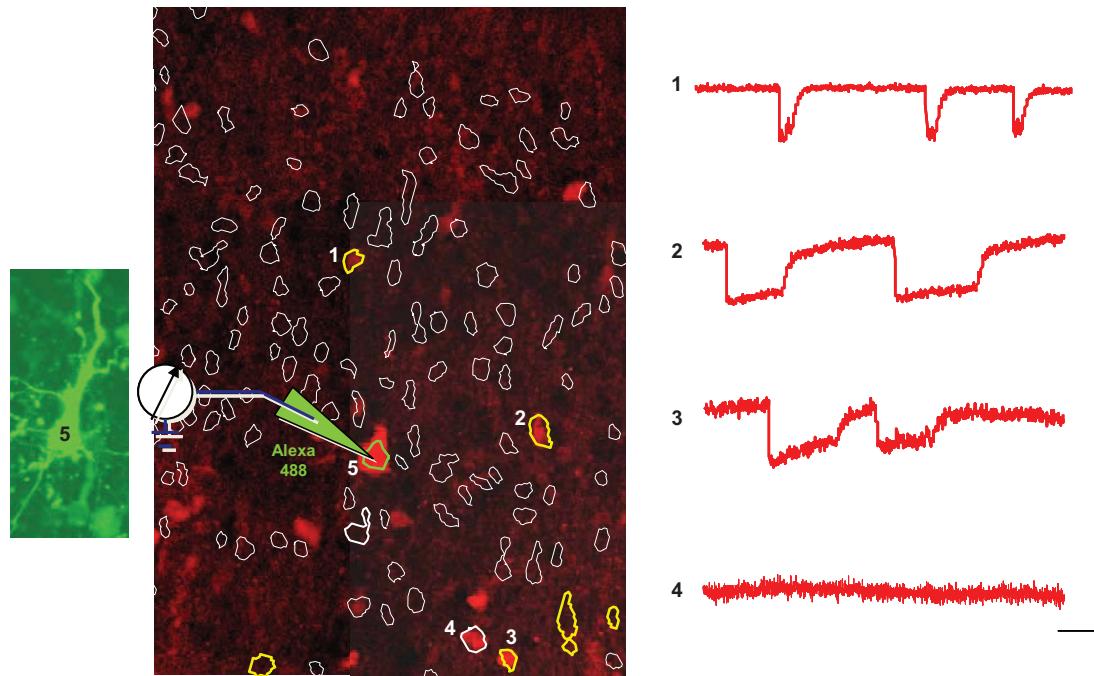


Figure 2 : Une faible proportion de cellules SPA déclenche un programme apoptotique.

La carte des contours de l'imagerie calcium d'une tranche corticale de souris à P4 est superposée à l'image confocale des cellules positives pour la caspase 3. Les contours jaunes représentent les cellules SPAs. Les cellules numérotées de 1 à 3 sont les cellules SPAs se superposant au signal caspase 3 et dont les tracés de fluorescence calcium sont représentés à droite de l'image par les numéros correspondants. Une cellule inactive en imagerie calcium est positive pour la caspase 3 (cellule 4) et aucune cellule GDP n'est caspase 3 positive. La cellule 5 est marquée à l'alexà 488 et représente simplement un point de repère dans la tranche pour superposer les deux images. Barre d'échelle : 20 sec et 20%DF/F

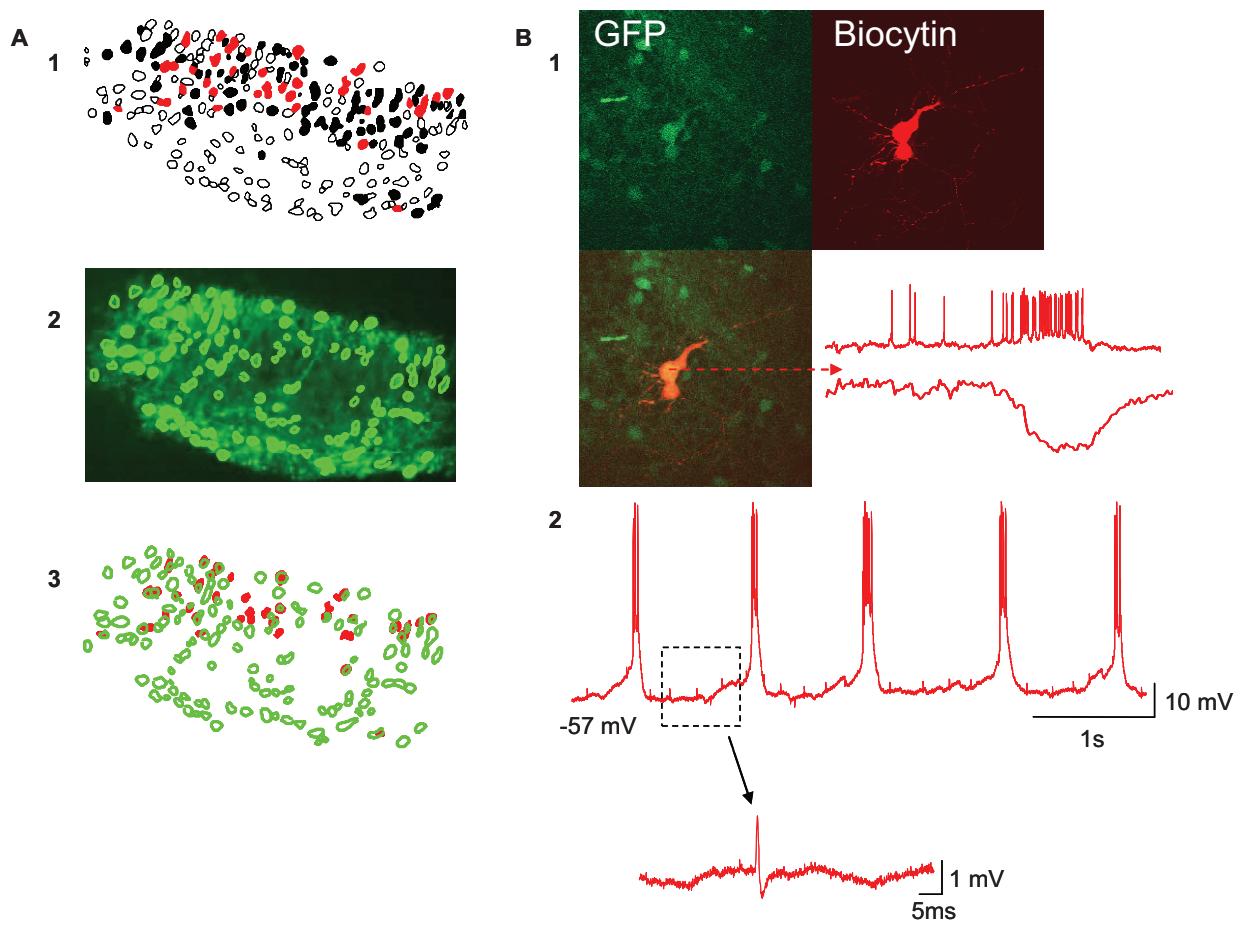


Figure 3 : Les interneurones GABAergiques sont largement impliqués dans l'activité SPA.

A. En superposant la carte des contours des cellules actives pour lesquelles les contours pleins rouges représentent les cellules SPAs, les contours pleins noirs les autres cellules actives, les contours cerclés de noir, les cellules silencieuses (1), avec l'image de fluorescence GFP pour laquelle les cellules cerclées de vert sont GFP, donc GAD67 positives (2), on obtient la carte des neurones GABAergiques associés à leur activité calcium (3) au sein de la région CA1 d'une tranche d'hippocampe de souris à P2. Notons qu'un large nombre d'interneurones est impliqué dans les SPAs (ici 27 interneurones sont impliqués dans les SPAs sur 40 cellules SPAs au total). B.I. L'image de fluorescence GFP représentant les cellules GAD67 positives superposée à l'image du marquage à la neurobiotine de l'interneurone patché, montre que cet interneurone est couplé avec un second interneurone GABAergique. Cet interneurone exprimait une activité de type SPA comme le montre le tracé de l'enregistrement électrophysiologique en mode courant imposé et le tracé de la fluorescence calcium correspondant (en bas à droite). Au dessous, le tracé de l'enregistrement électrophysiologique sur une échelle de temps plus large montre la présence de « spikelet », dont l'un d'eux est représenté sous le tracé à plus fort grossissement et indique le couplage électrique de ces deux interneurones par des jonctions gap.

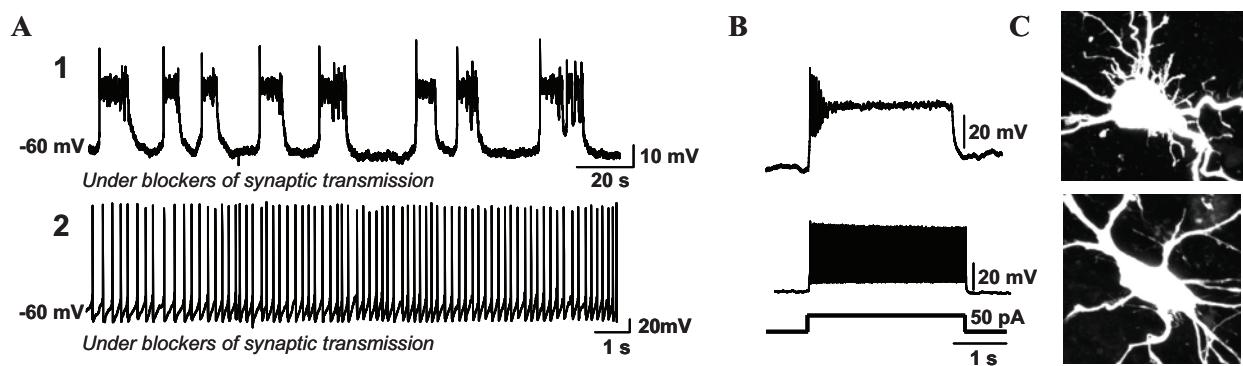


Figure 4 : Propriétés morpho-physiologiques des neurones GABAergiques impliqués dans les SPAs.

A.I. Enregistrement en mode courant imposé d'un neurone GABAergique SPA dans la région CA3 de l'hippocampe d'une souris KI GAD67-GFP à P4. Notons les oscillations récurrentes du potentiel membranaire à -60 mV en présence des bloqueurs de la transmission synaptique. B.I. Patron de décharge de potentiels d'action en réponse à l'injection d'un créneau de courant positif au sein de ce même interneurone SPA. Notons la forte adaptation de la décharge des potentiels d'action. C.I. Image du marquage à la neurobiotine du soma d'un interneurone SPA à fort grossissement. Barre d'échelle : 10 μ m. Notons la présence de protrusions somatiques. L'ensemble de ces caractéristiques représentées en (A,B,C I.) sont spécifiques des SPAs. A, B & C 2. sont similaires de (A, B, & C I.) mais pour un neurone GABAergique participant aux GDPs. Notons que contrairement aux interneurones SPA, l'interneurone GDP présente une décharge continue de potentiels d'action à -60 mV en présence des bloqueurs de la transmission synaptique, une réponse à l'injection de courant dépolarisant de type patron à potentiels d'action rapides et un soma dépourvu de protrusions.

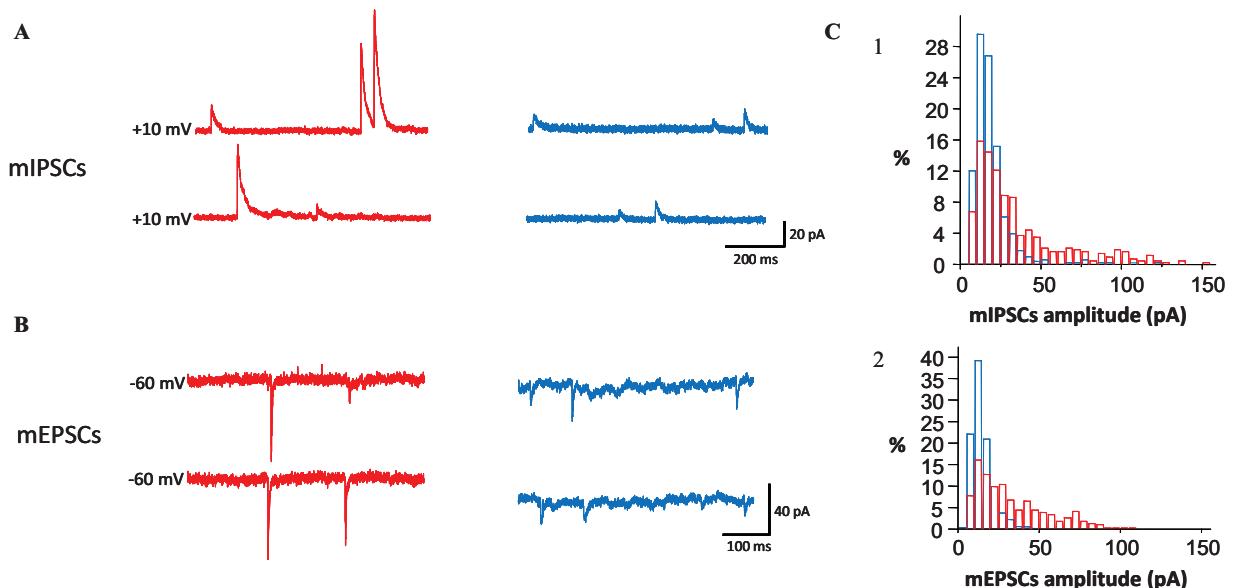


Figure 5 : Comparaison des courants postsynaptiques miniatures reçus par les interneurones impliqués dans les SPAs et impliqués dans les GDPs.

A. Courants postsynaptiques miniatures GABAergiques (mIPSCs) de deux interneurones SPA (rouges) et de deux interneurones GDP (bleu) enregistrés dans la région CA3 d'une tranche d'hippocampe de souris KI GAD67-GFP à P4. B. Courants postsynaptiques miniatures AMPA (mEPSCs) de deux interneurones SPA (rouges) et deux interneurones GDPs (bleu) C.1. Histogramme représentant la distribution des amplitudes des mIPSCs des interneurones SPA et des interneurones GDP. C.2. Histogramme représentant la distribution des amplitudes des mPSCs. Notons le fort biais à droite de la distribution des mPSCs à la fois GABA et AMPA pour les interneurones SPA, indiquant une plus grande variété d'amplitudes et la fréquence plus élevée d'événements de grande amplitude.

		SPA	GDP	Statistics
Rm (MOhm)	Avg SD n	677.1 73.2 4	750.8 46.1 4	t test p>0.05
Cm (pF)	Avg SD n	53.7 5.3 4	56.8 6.5 4	t test p>0.05
Vrest (mV)	Avg SD n	-41.9 3.0 4	-75.9 3.2 4	t test p=0,002
A.P. Amplitude (mV)	Avg SD n	66 5.8 4	96 9.8 4	t test p=0,04
A.P. threshold (mV)	Avg SD n	-61 4.6 4	-60 5.8 4	t test p>0.05
A.P. duration (ms)	Avg SD n	4 0.7 4	2 0.1 4	t test p=0,01

Table I: Propriétés électrophysiologiques des interneurones SPA et GDP

Rm : résistance membranaire ; Cm : capacitance membranaire ; Vrest : potentiel membranaire de repos ; A.P. : Potentiel d'Action ; Avg : moyenne ; SD : écart type.

	SPA	GDP	Statistics
sIPSCs			
Amplitude (pA)	35 +/- 4 n=5	29 +/- 9 n=5	Mann-Whitney P<0.001
Frequence (Hz)	1.9 +/- 0.4 n=5	2.6 +/- 0.8 n=5	t test p>0.05
Rise (ms)	1.4 +/- 0.2 n=5	3.2 +/- 1.2 n=5	Mann-Whitney p>0.05
Decay (ms)	10 +/- 2 n=5	24 +/- 5 n=5	t test p=0,03
mIPSCs			
Amplitude (pA)	33 +/- 4 n=5	21 +/- 6 n=5	Mann-Whitney P<0.001
Frequence (Hz)	0.6 +/- 0.1 n=6	0.7 +/- 0.5 n=6	Mann-Whitney p>0.05
Rise (ms)	1.4 +/- 0.2 n=6	2.5 +/- 1 n=6	Mann-Whitney p>0.05
Decay (ms)	10 +/- 1.5 n=6	16 +/- 4 n=6	t test p>0.05
sEPSCs			
Amplitude (pA)	23 +/- 5 n=5	28 +/- 9 n=4	Mann-Whitney P>0.085
Frequence (Hz)	1.6 +/- 0.4 n=5	4.4 +/- 3 n=4	t test p>0.05
Rise (ms)	0.8 +/- 0.2 n=5	1.6 +/- 0.4 n=4	t test p>0.05
Decay (ms)	3.5 +/- 1 n=5	9.4 +/- 4 n=4	t test p>0.05
mEPSCs			
Amplitude (pA)	31 +/- 6 n=6	15 +/- 0.5 n=4	Mann-Whitney P<0.001
Frequence (Hz)	0.6 +/- 0.1 n=6	2.3 +/- 0.6 n=4	Mann-Whitney p>0.05
Rise (ms)	0.6 +/- 0.1 n=6	1.9 +/- 0.2 n=4	Mann-Whitney p>0.05
Decay (ms)	3 +/- 0.7 n=6	7.6 +/- 0.3 n=4	Mann-Whitney P=0.01

Table 2: Propriétés des courants postsynaptiques des interneurones SPA et GDP.

sIPSCs et mIPSCs : courants postsynaptiques inhibiteurs respectivement spontanés et miniatures.

sEPSCs et mEPSCs : courants postsynaptiques excitateurs respectivement spontanés et miniatures.

		SPA	GDP	Statistics
Dendritic shafts	Avg	3.6	6.8	t test p=0.002
	SD	0.2	0.7	
	n	7	7	
Somatic Protrusions*	Avg	8.4	2	t test p=0,002
	SD	0.1	0.71	
	n	7	7	

Table 3: Quantification des dendrites et des protrusions somatiques des interneurones SPA et GDP.
 Avg : moyenne ; SD : écart type ; * < 7 microns

Synchronous Plateau Assemblies represent a critical morpho-physiological stage in the development of GABAergic interneurons

C. Allene, M. A. Picardo, P. Guigue, A. Baude, H. Becq and R. Cossart

It is now well established that most developing neuronal networks display a variety of coordinated activity patterns that should provide essential signals for circuit maturation. During brain development, the same structure will sequentially express different forms of spontaneous patterned activity. We have recently described a common sequence for the maturation of population coherence in neocortical and hippocampal networks. In these structures, population coherence emerges at birth in the form of **Synchronous Plateau Assemblies** that synchronize small groups of neurons coupled by gap junctions before involving most neurons in the form of synapse-driven **Giant Depolarizing Potentials**. These patterns are mutually exclusive as **GDPs** actively shut off the production of **SPAs**. In order to assign a possible function to the **SPA** pattern, we have studied the fate and the morpho-physiological properties of single **SPA**-cells as a function of network maturation. We focused our analysis on hippocampal **GABAergic** neurons. To study individual cell fates we have designed an experimental approach that enables us to perform repeated imaging of the same neuronal populations on a daily basis. We show that cells involved in **SPAs** switch to a **GDP** pattern of activity within one day and that this transition is paralleled by a remarkable evolution of their morpho-physiological properties; **SPA**-interneurons present an immature firing pattern, receive exceptionally large miniature currents and display remarkable somatic filopodia that all disappear when these interneurons participate in **GDPs**. Therefore the involvement of interneurons in **SPAs** marks a remarkable step in their morpho-physiological development.

As development proceeds, spontaneous synchronous neuronal activity displays changing spatio-temporal dynamics that are controlled by distinct cellular mechanisms, thus resulting in a sequence for the maturation of network activity patterns (Allene et al., 2008;Blankenship et al., 2009;Crepel et al., 2007;Khazipov and Luhmann, 2006;McCabe et al., 2006;Sibilla et al.,

2009;Syed et al., 2004;Yang et al., 2009). Given the largely documented role of activity in the maturation of cortical neurons (Cancedda et al., 2007;Lin et al., 2008b;Moody and Bosma, 2005;Wang and Kriegstein, 2008) and circuits (Huang, 2009;Katz and Shatz, 1996;Pfeffer et al., 2009), the sequential maturation of network patterns is likely not only to reflect merely the emergent expression of a precise sequence in the development of individual neuronal properties but also to participate in proper cell maturation (Moody & Bosma, 2005; Lischalk et al., 2009; Ganguly et al., 2001; McCabe et al., 2006). In other words, activity itself would create a feedback loop that triggers the changes in neuronal and circuit properties that serve to terminate one network pattern and start the next. Interestingly, the timetable and mechanisms for the maturation of spontaneous patterned activity is remarkably robust across peripheral and central brain structures (Allene and Cossart, 2009;Ben Ari, 2001;Blankenship and Feller, 2010), indicating that the signals linking activity to the maturation of neurons and their connections could be general as well. We have recently dissected this sequence in both the hippocampus and neocortex, using a multiparametric approach combining calcium imaging and electrophysiology (Crepel et al. 2007; Allene et al. 2008). In both regions, the earliest coherent electrical activity pattern emerges around birth in the form of Synchronous Plateau Assemblies (SPAs), so called because of their characteristic spatial-temporal dynamics: SPAs involve discrete groups of gap-junction coupled neurons producing synchronous calcium plateaus associated with characteristic membrane potential oscillations (Crepel et al. 2007; Allene et al. 2008). This pattern is gradually switched off towards the end of the first postnatal week, as Giant depolarizing potentials (GDPs) (Ben-Ari et al. 1989) start synchronizing large groups of synaptically-connected neurons. What would be the function carried by the transient expression of SPAs for the maturation of cortical neurons morpho-physiological properties? It is now well established that GABAergic transmission is central for the generation of GDPs (Ben-Ari et al. 1989, Garaschuk et al. 1998, Sipila et al. 2005, Sipila et al. 2006, Bonifazi et al. 2009), indicating that SPAs could be a crucial step for the maturation of GABAergic interneurons.

In order to test this hypothesis we have followed the morpho-physiological fate of hippocampal GABAergic interneurons at the intermediate stage between SPA- and GDP-dominated network activities. To this aim, we used GAD67-KI mice in which GABAergic neurons are GFP labelled. We have developed an approach using chronic daily multineuron calcium imaging of the same neuronal populations in organotypic hippocampal to follow the individual fate of cells involved in SPAs (SPA-cells) as a function of network maturation. We

also combined calcium imaging with targeted current and voltage-clamp recordings in acute hippocampal slices, as well as morphometric analysis in order to compare the morphophysiological properties of cells involved in SPAs and in GDPs (GDP-cells). With this compound approach, we show that the GABAergic interneuron population is involved in SPAs and that SPA-interneurons can progress to a GDP activity pattern within one day. Interestingly, interneurons switch their morpho-physiological properties as soon as they start getting involved in GDPs. In particular we show that GABAergic neurons producing SPAs exhibit immature intrinsic and morphological properties. They display long somatic filopodia and giant GABA- and AMPA- receptor mediated miniature events, both no longer observed in GDP interneurons. Altogether these results show that the transition between SPA and GDPs is paralleled by a significant evolution of the morpho-physiological properties of GABAergic interneurons. We therefore propose that the large calcium plateaus occurring during SPAs serve the maturation of GABAergic interneurons and therefore favour the emergence of GDPs, network patterns driven by GABAergic transmission.

Material and Methods

Acute slice preparation and calcium imaging. Transverse hippocampal slices (380 µm thick) were prepared from 3 to 6-day-old (P3-6) GAD-67 knock in GFP mice (Tamamaki et al., 2003) using a vibratome (leica Microsystems, microtomes VT1200 S) in ice-cold oxygenated modified artificial CSF (mACSF: 0.5 mM CaCl₂ and 7 mM MgSO₄; NaCl replaced by an equimolar concentration of choline). Slices were then transferred for rest (around 1 h) in oxygenated normal ACSF containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1.3 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, and 10 D-glucose, pH 7.4. For AM-loading, slices were incubated in a small vial containing 2.5 ml of oxygenated ACSF with 25 µl of a 1 mM fura-2 AM solution (Molecular Probes; in 100% DMSO) for 20–30 min. Slices were incubated in the dark, and the incubation solution was maintained at 35°–37°C. Slices were perfused at a rate of 4 ml/min with continuously aerated (95% O₂ / 5% CO₂) normal ACSF at 35–37°C. Imaging was performed with a multibeam two-photon laser scanning system (Trimscope-LaVision Biotec) coupled to an Olympus microscope as previously described (Crépel et al., 2007). Images were acquired through a CCD camera (La Vision Imager 3QE), which typically resulted in time resolution around 100 ms (2 × 2 binning, pixel size: 600 nm). Slices were imaged using a low-magnification, high-numerical-aperture objective (20x, NA 0.95, Olympus). The size of

the imaged field was typically $430 \times 380 \mu\text{m}^2$. Imaging depth was on average $80 \mu\text{m}$ below the surface (range: $50\text{--}100 \mu\text{m}$).

Organotypic slice culture preparation and calcium imaging. Organotypic slices were prepared from the hippocampus of P4 GAD-67 knock in mice according to the procedure described by Stoppini et al. (1991) with minor changes. Mice were decapitated under deep anesthesia with chloral hydrate (i.p., 350 mg/kg). Following the removal of the brain, hippocampal sections, $400 \mu\text{m}$ thick, were prepared using a tissue chopper (Mc Ilwain, U.S.A.) and collected in a PBS solution supplemented with 0.5% D-glucose. Slices were then kept at 4°C for 30 min in PBS-glucose and then placed onto Millicell- CM culture inserts ($0.4 \mu\text{m}$; Millipore). The inserts were placed into 6-well culture plates with 1 mL MEM (Sigma) supplemented with: glucose (25 mM), HEPES (30 mM), $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{H}_2\text{O}$ (5 mM), L-glutamine (3 mM), L-ascorbic acid (0.5 mM), CaCl_2 (2 mM), MgSO_4 (2.5 mM), insulin (1 mg/L), phenol red (2 mL/L of 0.5% solution), pH $7.25\text{--}7.29$, and horse serum (20% ; Sigma). Slices were maintained in a cell culture incubator at 37°C , in an atmosphere containing 5% CO_2 . Imaging was performed on the second and third day following slice preparation. Slices are left in their initial culture plates with the MEM for the entire experimental protocol. For AM-loading, 1 ml of regular, but filtered, ACSF as well as $2 \mu\text{l}$ of a 1 mM Fura-2AM solution (Molecular Probes; in 100% DMSO) were added on slices for $20\text{--}30 \text{ min}$ in the cell culture incubator. Just before calcium imaging, 1 ml of freshly filtered ACSF was added onto the slices and removed just after. For pharmacological experiments, 1 ml of filtered ACSF containing $10\mu\text{M}$ of bumetanide was added onto the slice. The culture plate was kept in the cell culture incubator for 15 minutes prior to imaging. Each culture plate containing slices to be chronically imaged, was manipulated under a sterile atmosphere to avoid culture contamination. Also the microscope objective was disinfected just before each imaging session.

Analysis. As previously described (Crepel et al., 2007), analysis of the calcium activity was performed with a custom-made software written in Matlab (MathWorks). This program aimed at the automatic identification of loaded cells and at measuring their fluorescence as a function of time. The calcium signal of each cell was the average fluorescence within the contour of that cell, measured as a function of time. Signal-processing algorithms of MiniAnalysis software (Synaptosoft) were used to detect the onsets and offsets (time of half-amplitude decay) of calcium signals within the traces of individual cells. Active cells are neurons exhibiting at least one calcium event within the period of recording. The frequency

of a network pattern was the averaged time interval between two peaks of synchronous activity. The incidence was the fraction of slices in which it could be recorded at least once. The amplitude of a network pattern in a given movie was the average of the maximum of cells coactive in each peak of synchrony across the movie. To identify peaks of synchronous activity that included more cells than expected by chance, we used interval reshuffling (randomly reordering of intervals between events for each cell) to create a set of surrogate event sequences. Reshuffling was performed 1000 times for each movie, and a surrogate histogram was constructed for each reshuffling. The threshold corresponding to a significance level of $p < 0.05$ was estimated as the number of coactive cells exceeded in a single frame in only 5% of these histograms. Experimental values are given as means \pm SEMs. Student's *t* test and Mann-Whitney test were used for statistical comparisons. $p < 0.05$ was considered significant. The entire procedure could be performed on-line sufficiently quickly to identify cells for targeted patch-clamp recordings.

For the analysis of organotypic slice experiments, the difficulty was to track the position of single-cells across days because neurons tend to move mainly due to the continuous slice flattening in the culture plate. Typically, three different focus plans are necessary to recover all the cells imaged a day before. To track each cell in a given network between two imaging sessions separated by one day, we took great care in keeping a constant orientation for the slices under the two-photon microscope. We also used the gross hippocampal architecture to find the same field of interest (i.e. usually centred on the beginning of the CA3c region), as well as easily recognizable visual cues provided by the GFP labelling patterns.

Electrophysiology. Neurons were patch-clamp recorded in the whole-cell configuration. For voltage-clamp experiments, the composition of the intracellular solution was: 120 mM Cs-gluconate, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM Na₂ adenosine triphosphate, 10 mM HEPES. With this solution glutamate-R-mediated postsynaptic currents (PSCs) reversed at +10 mV while GABA_AR-mediated PSCs reversed at -60 mV. Under those conditions, IPSCs were recorded as outward currents at holding potential of +10 mV. Miniature Inhibitory and Excitatory PostSynaptic Currents (mIPSCs and mEPSCs) were collected in the presence of TTX (1 μM, Tocris) at a holding potential of +10 and of -60 mV respectively. For current clamp recordings, the intracellular solution contained: 130 mM K-methylSO₄, 5 mM KCl, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2.5 mM Mg-ATP, and 0.3 mM GTP. No correction for liquid junction potential was applied. The osmolarity was 265–275 mOsm, pH 7.3.

Microelectrode resistance was 4–8 MΩ. Uncompensated access resistance was monitored throughout the recordings. Values <20 MΩ were considered acceptable and the results were discarded if it changed by >20%. Whole-cell measurements were filtered at 3 kHz using a patch-clamp amplifier (HEKA, EPC10). Recordings were digitized on-line (20 kHz) with a Labmaster interface card to a personal computer and acquired using Axoscope 7.0 software (Molecular Devices). Synchronization between optical and electrical signals was achieved by feeding simultaneously the Labmaster interface card with the trigger signals for each movie frame and the electrophysiological recordings. Recordings were analyzed using the MiniAnalysis software (Synaptosoft).

Results

Fate of SPA-cells as a function of network maturation

We had previously shown that the developmental decline of SPA, which started at P0-2 was clearly anticorrelated with the progressive expansion of GDPs that peaked at P6-10, in the CA1 region of the mouse hippocampus (Crepel et al.). Given that developmental cell loss has been reported at similar postnatal stages (Buss and Oppenheim, 2004; Raff et al., 1993), SPAs could be a pattern selectively expressed in a transient neuronal population, or alternatively be a transient step in the maturation of all neurons. In order to address directly this question, we have performed daily multineuron calcium imaging from the same neuronal populations in the CA3 region of organotypic hippocampal slices. We have specifically designed an experimental procedure to avoid culture contamination by repetitive imaging (see Methods). Organotypic slice cultures were prepared from rat pups on postnatal days 4 (P4) and were first monitored two days after, using the multibeam two-photon microscope. Thus, the first day of monitoring (D) corresponds to P6 and the day after (D+1), corresponds to P7. In order to validate organotypic hippocampal slice cultures as a useful model to study the maturation of coherent activity patterns during the first postnatal week, we compared the general aspect and activity patterns of organotypic versus acute hippocampal slices. According to previous observations (Gahwiler et al., 1997; Holopainen, 2005) the laminated structure as well as the main characteristic morphological organization of the organotypic hippocampal slices was well-preserved in our cultures (Figure 1A). More importantly, the activity patterns were similar to those previously described in acute slices during the first postnatal week (Crepel 2007). Indeed, we recorded a coherent activity pattern in every organotypic slice ($n = 4$) that was comparable with GDPs (Ben-Ari et al.

1989; Garaschuk et al. 1998; Crepel et al. 2007) in terms of calcium dynamics and pharmacological characteristics: they consisted of fast calcium events occurring simultaneously within one movie frame (i.e., < 100 ms) (Crepel et al., 2007) that were dependent on the excitatory actions of GABA as they were blocked by the selective NKCC1 antagonist bumetanide (frequency: to 11+/-11% to control and amplitude: 20+/-20% of control in bumetanide 10 μ M, n=5, p<0.05). Calcium plateaus corresponding to SPAs could also be recorded in organotypic slices. Note that the average frequency of organotypic slice GDPs was lower than the frequency measured in acute slices (0.04+/-0.01 Hz vs 0.08+/-0.01 Hz). The fraction of SPA-cells at P6 in organotypic hippocampal slices was significantly larger than that in acute slices at the same stage (27+/-6 % and 12.6+/-2.3 %, respectively), consistent with SPAs and GDPs being mutually exclusive. Therefore, except for the frequency of GDPs, both the general aspect and activity patterns were similar in organotypic and acute hippocampal slices. We can conclude that organotypic hippocampal slices are a fairly good model to study the maturation sequence of activity patterns during development. We next focused our analysis on the fate of individual SPA-cells. We found that the majority of SPA-cells integrated the synaptic network as they stopped producing calcium plateaus and participated in GDPs as the slice matured. Indeed, the fraction of SPA-cells involved in GDPs after one day in culture gradually increased whereas the fraction of SPA-cells still producing plateaus decreased (to 56+/-5 % and 11+/-1 % respectively (n=4 slices). Figure 1 B&C). In contrast, the majority of GDP-cells at D were still involved in GDPs at D+1 (67+/-11 %, n=4 slices, data not shown). We can conclude that cells involved in SPA and GDP patterns are not distinct cell populations but rather that the fate of the majority SPA-cells is to participate in GDPs as the network matures.

GABAergic interneurons are involved in SPAs

If the SPA stage is critical for the development of GDPs, it could be that GABAergic interneurons participate in the assemblies of oscillating SPA-neurons. In order to examine the involvement of GABAergic neurons in SPAs, we have quantified the proportion of interneurons producing calcium plateaus in GAD-67 GFP knock-in mice (Tamamaki et al., 2003) for which GABAergic cells are labelled with GFP. We focused on P0-3 and imaged the CA3 hippocampal region in the presence of blockers of synaptic transmission (10 μ M bicuculline, 10 μ M NBQX, 40 μ M D-APV) to isolate cells generating calcium plateaus independently from synaptic transmission. The contour maps corresponding to GFP positive

neurons were superimposed to those of the distribution of neurons producing SPAs (see methods, Fig.3A). We found, in several instances, that groups of SPA cells could involve a majority of GFP positive contours (up to 68% and on average 22+/-37 % SPA-cells were GFP+; n=14 slices, Fig.3A). Targeted patch-clamp recordings confirmed that GFP positive SPA neurons indeed produced the characteristic membrane potential oscillations associated with SPAs. Moreover, in a few cases we observed dye labelling of two interneurons as well as spikelets, indicating a direct gap junction coupling between SPA-cells (Figure 3B). Therefore, GABAergic neurons are involved in SPAs before the emergence of GDPs.

GABAergic interneurons involved in SPAs present immature morphophysiological features as compared with interneurons participating in GDPs.

Given that GABAergic transmission is central for the generation of GDPs (Ben Ari et al., 1989; Bonifazi et al., 2009; Crepel et al., 2007; Rheims et al., 2008a), we hypothesized that the transition between SPA- and GDP- activity patterns would be paralleled by discernible changes in the morpho-physiological properties of GABAergic interneurons. To test this hypothesis, we targeted both SPA- and GDP-interneurons for current and voltage clamp recordings and characterized their intrinsic and synaptic electrophysiological properties. Cells were also filled with neurobiotin while recording in order to analyse their morphological features after *post hoc* immunohistochemical processing.

As expected (Crepel et al., 2007), in current clamp mode, at resting membrane potential (V_{rest}), SPA-interneurons displayed recurrent membrane potential oscillations which are not affected by synaptic transmission blockade using GABA_A- AMPA- and NMDA-receptor antagonists (10μM bicuculline, 10μM NBQX, 40μM D-APV, n=14 cells, fig 4A1). Most GDP-interneurons were also spontaneously firing at V_{rest} in the presence of synaptic blockers, however, in contrast to SPA-interneurons, they tonically fired action potentials (fig 4 A2). We also investigated the firing patterns of interneurons in response to a depolarizing current step. We found that all SPA-interneurons displayed a strongly adapting pattern (n=9, fig 4 B1) whereas GDP-interneurons presented a variety of firing patterns that could be classified, according to the Petilla nomenclature (Ascoli et al., 2008) as, fast spiking (n=12, fig. 4B2), non-adapting (n=2), adapting (n=4), irregular spiking (n=2) or stuttering (n=1). In addition, the resting membrane potential (V_{rest}) as well as the action potential (AP) amplitude and duration were significantly different between SPA and GDP interneurons: SPA-cells displayed a more depolarized V_{rest} and a broader and smaller AP (table 1), all features indicating a

rather immature physiological stage of development (McCormick and Prince, 1987; Spigelman et al., 1992; Belleau and Warren, 2000; Ahuja and Wu, 2000; Zhang, 2004; Kasper et al. 1994 ; Okaty et al., 2009; Doischer et al., 2008). In contrast, the membrane resistances (R_m) and capacitances (C_m) of SPA- and GDP-interneurons were not significantly different (see Table 1). This is surprising given that C_m usually indirectly quantifies the cell surface (Major et al., 1994; Thurbon et al., 1998; Chitwood et al., 1999) but it could originate from the fact that we have sampled from a heterogenous population gathering different types of interneurons as clearly indicated by the variety of firing patterns described above.

We next recorded spontaneous and miniature Excitatory and Inhibitory PostSynaptic Currents (sEPSC/sIPSCs and mEPSC/mIPSCs respectively). With our intracellular solution, IPSCs are mediated by GABAergic transmission while EPSCs are mediated by glutamatergic receptors. We found that the average amplitude of miniature events received by SPA-interneurons was significantly higher than that received by GDP-interneurons (see table 2 and fig 5). Histograms of the distribution of mIPSC and mEPSCs amplitudes of both SPA- and GDP-interneurons were unimodal and except for the distribution of mEPSCs of GDP-cells, the distribution of mPSCs were skewed towards larger events, and present an high standard deviation (SD= 33.7 and 21 for SPA- and GDP-cell mIPSCs respectively and 27 vs 6.5, for SPA- and GDP-cells mEPSCs Fig. 5C et table 2). Note that if mIPSCs of both SPA and GDP-cells present the same trend: a right skew distribution and a high standard deviation, there are both stronger for SPA-cells. We can conclude that when cells are involved into SPA stage, there present a higher variability of current amplitudes with, on average, significantly higher amplitude values than when cells are involved into GDP stage.

Last we compared the morphological properties of SPA and GDP interneurons. We found that SPA-interneurons displayed a striking morphological feature as they exhibited numerous filopodia-like processes on their somata whereas the cell body of GDP-interneurons was generally smooth but had more dendritic shafts arising from them (fig 4C and table 3).

We can conclude that GABAergic interneurons can dramatically shift their morphophysiological properties within one day at the time of emergence of GDPs.

Discussion

In the present study we have studied the fate of the cells involved in the first coherent activity pattern (SPAs) during network maturation. We show that the main fate of SPA-cells is to integrate into the more mature network represented by GDPs. Such a fate is

accompanied by the disappearance of characteristic morpho-physiological properties such as giant miniature postsynaptic currents or somatic filopodia. These results bring a direct evidence for the strong link between circuit and single-cell maturations and in particular show how the dramatic developmental switch in the morpho-physiological properties of GABAergic interneurons forecasts the emergence of synapse-driven GDPs.

I. SPA cells integrate the synaptic network and participate in GDPs

Until now, the two studies describing the sequential maturation of SPA and GDP patterns, during the first postnatal week in rodents, used only acute slices (Crepel et al., 2007; Allene et al., 2008), providing only successive snapshots of network development. It was therefore impossible to conclude whether the same neuronal populations were sequentially involved in SPAs and then GDPs. Here, we have developed an approach using organotypic slices to follow the individual fate of cells involved in SPAs as a function of network maturation. With this approach, we show that the majority of SPA-cells integrate the GDP network within one day. In parallel, we noted the opposite trend for the GDPs since a majority of GDP-cells stay involved into GDP network. These results are consistent with previous reports describing the developmental profile of the maturation sequence which describes the decline of SPA activity when GDP activity starts to appear (Crepel et al., 2007; Allene et al., 2008).

The major difference between organotypic and acute hippocampal slices concerns the frequency of GDPs, lower in the latter than the former. This difference is probably explained by the plasticity taking place over the course of the culture period as a compensatory response for the cutting of axonal projections, which inevitably occurs during slice preparation. (Lossi et al., 2009 ; De Simoni et al., 2003; Adcock et al., 2004; Fenili and De Boni, 2003). Indeed, previous studies showed that this plasticity concerns the pattern of dendritic branching, which appears more complex in organotypic hippocampal and cerebellar slices than in their acute counterparts (De Simoni et al., 2003; Adcock et al., 2004; Fenili and De Boni, 2003). Consistently with this, Edwards and collaborators show a significant increase in the frequency of glutamatergic miniature synaptic currents in organotypic hippocampal slices (De Simoni et al., 2003). In acute slices, such plasticity is probably weak as they are used within a few hours of preparation. This plasticity doesn't interfere with our analysis since we still observed both activity patterns: the SPAs and the GDPs in the organotypic hippocampal slices, initially described into acute slices (Ben-Ari et al., 1989; Garashuck et al., 1998; Allene et al., 2008; Crepel et al., 2007; Rheims et al., 2008) and since the results are

consistent with the ones of acute slices as mentioned above. So, results concerning the main two fate revealed by the organotypic slices, which are the integration of SPA-cells into GDPs and the steadiness of GDP-cells, seem to be relevant and specific from development.

As GDPs synchronize large network of cells in the hippocampal network (Crepel et al., 2007) it is likely that every cell participates in GDPs at a given time of their developmental journey (Pfeffer et al., 2009; Ben-Ari et al., 2007). In contrast, SPA activity is less massive and more local (Allene et al., 2008; Crepel et al., 2007), so it is still difficult to know if every cell will pass this stage or if it concerns only a subpopulation of cells. To conclude that SPAs are a universal and necessary stage for the maturation for each cortical cell, the fate of SPA-cells in the long-range has to be investigated but it requires different approaches like genetic fate mapping approach (Miyoshi & Fishell 2006; Batista-Brito & Fishell 2009).

2. SPA interneurons display immature morpho-physiological properties

According to some morpho-physiological properties of SPA-cells, it seems that SPA-cells are less mature than GDP-cells: 1) morpho-physiological characteristics specific from SPA-cells exist then disappear before the ones specific from GDPs-cells during perinatal development. 2) SPA-cells A.P. and firing pattern seem immature as they exhibit small amplitude and high duration A.P. 3) The ratio between the number of somatic filopodia and the number of dendritic shaft is higher for SPA- than for GDP-cells. Although, filopodia and even somatic filopodia, have been shown to be the precursor of dendrites (Vaughn 1989; Portera-Cailliau and Yuste, 2001; Portera-Cailliau et al., 2003; Sotelo and Dusart, 2009).

Are giant miniature postsynaptic currents of SPA-cells also a sign of immaturity? Such characteristic is more difficult to interpret. We speculated that SPA-cells would have specific GABA miniature postsynaptic currents since they integrate GABA-driven GDPs within few days. We were surprised to find that AMPA miniature postsynaptic currents present the same characteristics than GABA ones which are giant amplitudes and a strong right skew of their distribution. Two main explanations could account for such large amplitudes and the skew in distributions. First, mPSCs of SPA-interneurons could arise from distinct synapse subpopulations having unique pre- or post-synaptic properties. To test these possibilities, the relationships between the amplitude and the decay of individual mPSCs in each SPA-cells should be examined. Events arising from different classes of synapses having unique properties may be expected to produce clusters of events in such plots. Second, some events may be generated on portions of the cell closer to the soma than other events,

avoiding the attenuation of the recorded events happening for electrotonically distant postsynaptic sites. The second explanation seems to be more plausible than the first one since: 1) the specific amplitude and their distribution of SPA-cells mPSCs concern both the GABA and AMPA mPSCs, so the probability that two independent synapses, such as GABA and AMPA synapses, exhibit unique synaptic properties giving the same consequences, seems very low. 2) the number of somatic filopodia is higher than the number of dendritic shaft for SPA-cells, representing an ideal condition to limit electrotonic attenuation of any type of currents arriving on such somatic protrusions and so favour large amplitude events.

Previous studies have reported that the activation of L-type calcium channels induce the activation of the factor CREB, which is involved in pathway promoting dendritic growth (Neal et al., 2010; Redmond and Ghosh, 2005; Wong and Ghosh, 2002). Also, SPA activity is characterised by a massive calcium entrance via L-type calcium channel into the cells, independent from synaptic transmission (Crepel et al., 2007), so the intrinsic SPA activity could bear somatic filopodia. As we suggested above, filopodia create morphological conditions to get giant miniature currents and according to our initial feedback loop hypothesis, the giant miniature currents could favour in turn the end of the filopodia growth to get dendritic shaft. Several studies have shown that miniature events play important roles including the regulation of postsynaptic firing, of dendritic spines and of synapse homeostasis (McKinney et al., 1999; Carter and Regehr, 2000; Frank et al., 2006). Thus, giant miniature currents of the present study could also allow the maturation of electrophysiological properties of cells necessary to integrate GDPs. The function of SPAs may be the induction of both specific morphological and physiological states of cells which favour their integration into GDPs. As we have already shown for the SPA calcium plateaus which are turn off when GDPs occur in the network (Crepel et al., 2007), once SPA-cells integrated, GDPs could switch off their specific morpho-physiological properties. Further investigations focusing on the role of those morpho-physiological properties specific from SPA will help us to achieve the understanding of the role of this first coherent maturation stage.

Discussion générale

Au cours de ce travail de thèse nous avons montré que le premier patron d'activité neuronale cohérent du développement, les SPAs, initialement décrits au niveau de l'hippocampe (Crepel et al., 2007), sont exprimés au sein du néocortex. Parallèlement, nous avons décrit la mise en place séquentielle des patrons d'activité neuronale corrélée du néocortex en développement au cours de la première semaine postnatale chez le rongeur (voir figure 1). Nous avons ainsi découvert une surprenante caractéristique concernant un des patrons d'activité neuronale de cette séquence néocorticale : les ENOs, décrits pour la première fois il y a dix ans. En effet, nous avons montré que les ENOs sont fortement favorisées en condition d'anoxie transitoire. Enfin, nous avons approfondi l'étude fonctionnelle des SPAs dont nous avons montré l'expression au sein de la population des interneurones GABAergiques ainsi que leur devenir : l'intégration au réseau synaptique des GDPs, corrélé aux profonds changements de leurs propriétés morpho-physiologiques. La discussion qui suit concernera d'abord la question de la signification des ENOs : leur expression au cours du développement était-elle physiologique ou pathologique? (Allene and Cossart, 2009) puis nous reviendrons sur le premier patron d'activité neuronale cohérent de la séquence : les SPAs dont nous discuterons les fonctions possibles au cours du développement.

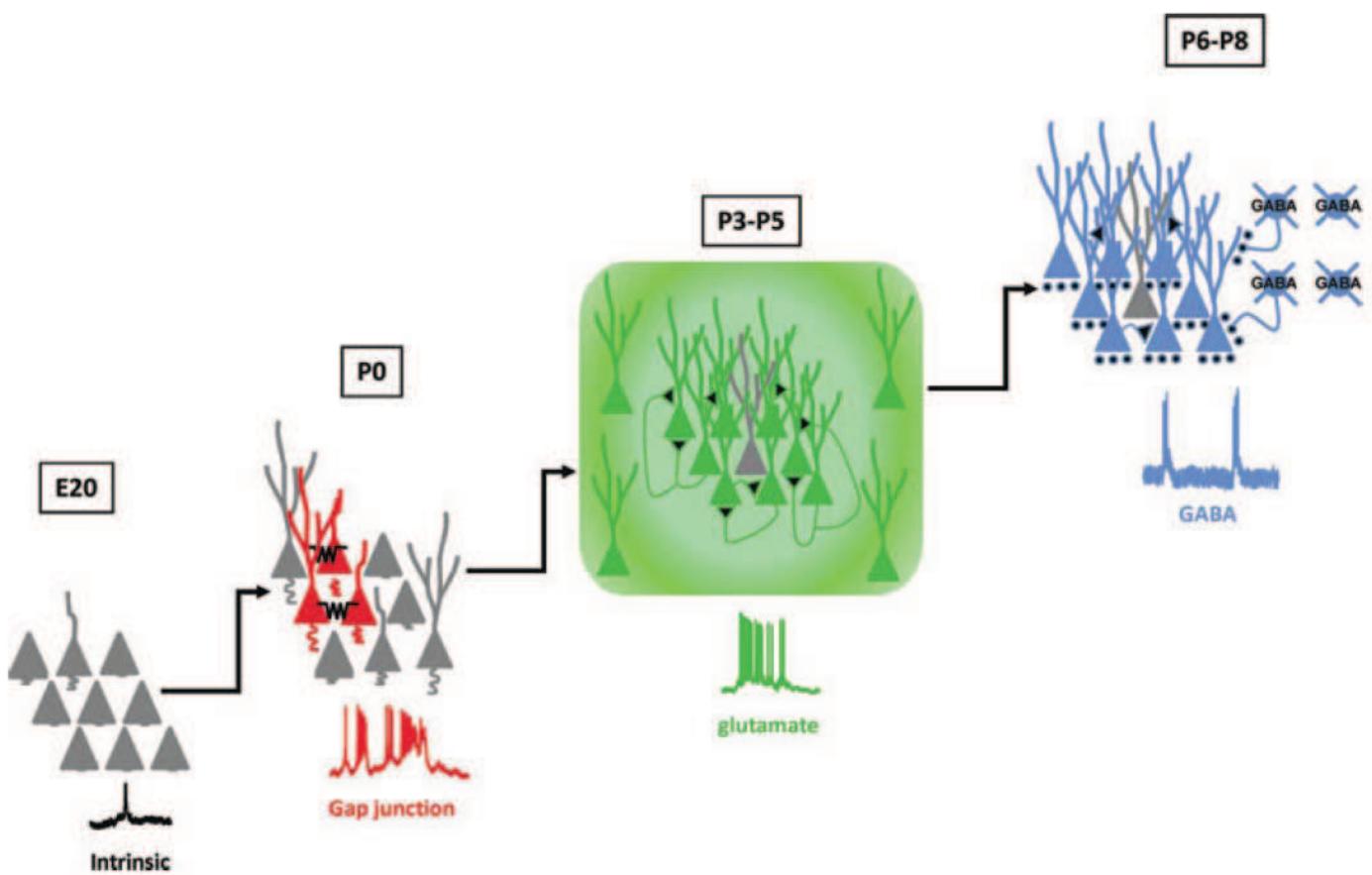


Figure 1 : Séquence générale de mise en place des patrons d'activité neuronale corrélée du néocortex en développement.

Représentation schématique de la séquence de maturation des patrons d'activité électrique neuronale synchronisée de la fin du stade embryonnaire à la fin de la première semaine postnatale au sein des tranches néocorticales chez le rongeur. À la fin du stade embryonnaire l'activité n'est pas corrélée. À la naissance elle se synchronise à travers les jonctions gap et se génère par l'activation des conductances intrinsèques dépendantes du potentiel (SPAs). Plus tard, ces activités de réseau sont transmises par les synapses glutamatergiques (ENOs) ou GABAergiques (GDPs). Notons que les récepteurs au glutamate extrasynaptiques sont aussi probablement impliqués dans la genèse des ENOs. La même séquence a été décrite dans l'hippocampe en développement (Crépel et al., 2007), avec l'exception du patron d'activité ENOs.

I. Les ENOs, sont-elles un patron d'activité neuronale physiologique ou pathologique ?

I.I . Les ENOs, oscillations transmises par les récepteurs NMDA : un rôle dans la maturation des synapses ?

Les ENOs sont des oscillations du réseau cortical en développement, transmises par les récepteurs NMDA (Garaschuk et al. 2000; Allene et al. 2008). Nous avons montré que les récepteurs NMDA contribuaient aussi à l'excitabilité neuronale du néocortex en développement en transmettant un courant tonique qui dépolarise le potentiel membranaire (Allene et al. 2008). Dans cette étude nous avons aussi montré l'implication des concentrations extracellulaires du glutamate dans la genèse des ENOs. Les ENOs sont donc en partie générées par le glutamate ambiant qui activerait les récepteurs NMDA extrasynaptiques (Allene et al. 2008). De plus, les patrons d'activité neuronale de la rétine et du néocortex semblent analogues, en particulier concernant l'implication des récepteurs glutamatergiques extrasynaptiques. En effet, Feller et ses collaborateurs, ont montré que la genèse des vagues rétiennes du stade III impliquait une augmentation du niveau de glutamate ambiant (Blankenship et al. 2009). L'analogie de ces deux patrons d'activité neuronale concerne aussi la dynamique de leurs événements (figure 2). En effet, les cinétiques des événements à la fois calcium et électrophysiologiques associés au vagues rétiennes du stade III sont aussi lentes que celles survenant lors des ENOs corticales (Blankenship et al. 2009, voir Figure 2). De telles similitudes entre les ENOs et le patron d'activité neuronale spontanée du développement que sont les vagues rétiennes, favorise l'hypothèse d'un rôle physiologique joué par les ENOs au cours du développement. Par ailleurs, plusieurs études indiquent que le signal transmis via les récepteurs NMDA joue un rôle de modulateur dans le recrutement synaptique des récepteurs AMPA et donc dans la mise en place de synapses fonctionnelles au cours du développement. (Feldmeyer & Cull-Candy, 1996; Zhu et al. 2000; Shi et al. 2001; Radnikow et al. 2002; Voigt et al. 2005; Brill & Huguenard, 2008; Wang & Kriegstein, 2008, voir la partie IV de l'introduction). Il est alors possible que les ENOs aient un rôle dans la conversion des synapses « silencieuses » en synapses actives et fonctionnelles. De plus, ce patron d'activité neuronale s'exprime juste avant la période d'évolution des synapses « silencieuses » ou « labiles » en synapses fonctionnelles (Groc et al., 2006), la diffusion de glutamate en dehors de la fente synaptique jouant un rôle critique dans cette conversion (Balland et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggèrerait donc un rôle des ENOs dans la régulation du recrutement synaptique

des récepteurs AMPA via les signaux transmis par les récepteurs NMDA. Cependant, le sens vers lequel cette régulation opère est moins évident. En effet, comme nous l'avons mentionné dans la partie IV de l'introduction, certaines études suggèrent que l'action du NMDA consiste en une régulation négative du recrutement des récepteurs AMPA au sein des synapses (pour revue : Hall and Ghosh, 2008), alors que d'autres proposent une régulation positive du recrutement des récepteurs AMPA par l'action du NMDA (Zhu et al. 2000; Shi et al. 2001; Voigt et al. 2005; Brill and Huguenard, 2008). Enfin, d'autres rapports suggèrent que la maturation de ces deux types de récepteurs est indépendante (Meguro et al. 1992; Okabe et al. 1998; Zhu and Malinow, 2002; Colonnese et al. 2003). Cette controverse souligne le rôle complexe des récepteurs NMDA au cours du développement (voir la partie II de l'introduction) et rend difficile l'attribution d'une fonction précise aux oscillations de réseau transmises par les récepteurs NMDA telles que les ENOs.

1.2. Les ENOs : un « état critique » du réseau en développement ?

La dynamique des ENOs se caractérise par un recrutement massif de populations neuronales à travers toutes les sous-régions corticales indépendamment des frontières anatomiques (Garaschuk et al. 2000; Adelsberger et al. 2005; Yang et al. 2009). De manière intéressante, au cours d'une période du développement limitée à 1 ou 2 jours chez le rongeur, ces larges synchronisations co-existent avec les événements plus locaux que sont les GDPs (Allene et al. 2008). La coexistence de ces deux patrons d'activité neuronale d'amplitudes très différentes pourrait être le signe d'un mode d'activité en « avalanche » au sein des tranches du néocortex en développement (Plenz and Thiagarajan, 2007; Werner, 2007). Le terme d'avalanches neuronales a été introduit récemment pour décrire le fait que la distribution de la taille des synchronisations neuronales spontanées pouvait suivre une loi de puissance où à la fois des événements locaux fréquents et des événements massifs rares pouvaient survenir au sein du même réseau (Plenz and Thiagarajan, 2007; Werner, 2007). Ce type d'organisation en avalanche est le signe d'un réseau dans un état critique et a été observé dans des cultures organotypiques de néocortex immature (Stewart and Plenz, 2008). Par définition, un état critique est à la limite de l'instabilité et n'importe quelle perturbation, même minime, peut le rompre. Plusieurs observations pourraient indiquer que les dynamiques de réseau du néocortex en développement peuvent rapidement passer à un état pathologique. L'exemple le plus frappant est probablement celui des crises auxquelles le néocortex est particulièrement sujet au cours du développement (Ben-Ari and Holmes, 2006; Bender and

Baram, 2007; Holmes and Ben-Ari, 2007; Scantlebury et al., 2007). Par exemple, il a été récemment montré que les GPDs au sein de cette région, le néocortex, évoluaient rapidement vers des états de crises de type interictales et ictales lorsque le niveau d'activité synaptique était augmenté pharmacologiquement (Rheims et al., 2008b). De même, le blocage des transporteurs des acides aminés excitateurs (EAAT) qui retire le glutamate de l'espace extracellulaire, induit un patron d'activité épileptiforme de type 'suppression burst' (Demarque et al., 2004). Ces lentes oscillations de réseau (SNOs pour Slow Network Oscillations) induites par le blocage pharmacologique des transporteurs EAAT, présentent des similitudes avec les ENOs induites par hypoxie (Allene et al. 2008) du point de vue de leurs dynamiques et des mécanismes sous-jacents (voir figure 2). Les SNOs semblent être la forme amplifiée des ENOs concernant la cinétique des événements individuels et la dynamique des activités neuronales. Par ailleurs, les encéphalopathies hypoxiques-ischémiques précoces observées chez les nouveaux nés humains sont souvent associées à des patrons d'EEG discontinus incluant les 'suppression bursts' (Biagioni et al., 1999; Milh et al., 2007a; Ohtahara and Yamatogi, 2003), lesquels, comme nous l'avons mentionné plus haut, présentent des dynamiques et des mécanismes cellulaires qui semblent similaires aux ENOs. De plus, les conditions d'hypoxie facilitent les ENOs (Allene et al. 2008) et altèrent la fonction du transporteur au glutamate (Dallas et al., 2007). L'ensemble de ces résultats suggère que les ENOs pourraient être un patron de réseau proche d'un état pathologique.

Ainsi, la ressemblance frappante des ENOs à la fois avec les vagues rétinienques du stade III et les avalanches neuronales qui représentent des patrons d'activité neuronale physiologiques et avec les oscillations induites par l'altération des transporteurs du glutamate EAAT qui représentent un patron d'activité neuronale pathologique, montre l'ambiguïté de ce patron d'activité. La question de leur fonction au cours du développement reste donc une question ouverte. Décrire le patron d'activité électrique *in vivo* correspondant aux ENOs aiderait certainement à comprendre leur fonction. C'est toutefois une tâche difficile, qui nécessiterait la combinaison de l'imagerie multineuronale avec des enregistrements électrophysiologiques.

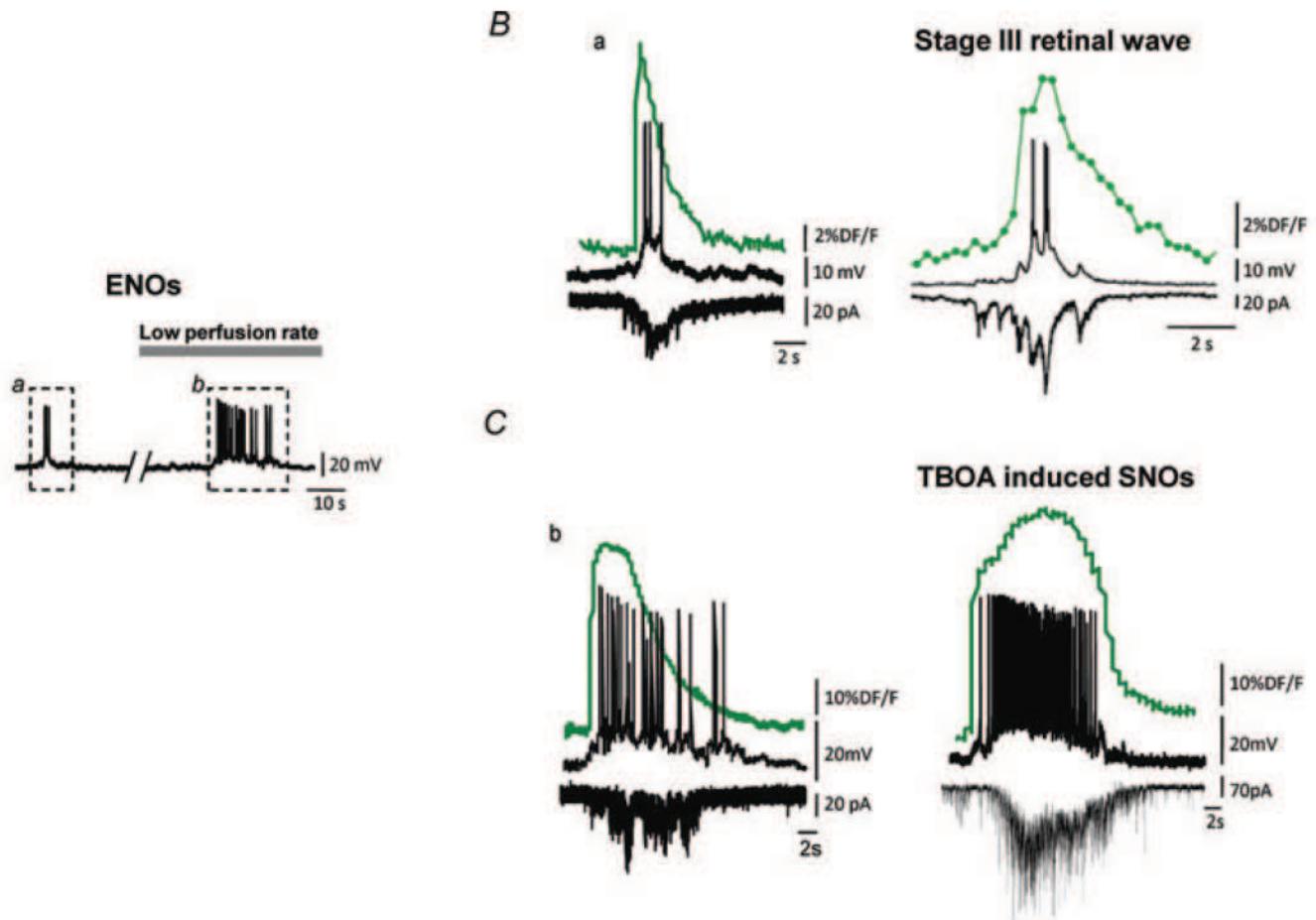


Figure 2 : Les ENOs présentent de fortes similarités avec des activités neuronales corrélées physiologiques et pathologiques.

A. Dépolarisations du potentiel de membrane associées aux ENOs enregistrées en mode courant imposé avant (a) et après (b) la diminution du taux de perfusion de liquide cérébro-spinal artificiel de 4 à 1 ml par min. Des effets semblables sont observés en condition de perfusion anoxique/aglycémique. B. Comparaison de la dépolarisation du potentiel membranaire (tracé noir, en haut), du signal de fluorescence calcium (vert) et des courants postsynaptiques excitateurs spontanés (sEPSCs, tracé noir, en bas, $V_m = -60$ mV) associés aux ENOs spontanées (Aa) et associés aux vagues rétinienques du stade III (extraites de Blankenship et al., 2009). Notons la similitude de ces deux patrons. C. Comme pour (B.) mais en comparant les ENOs produites en conditions d'anoxie modérée survenant lors de la diminution du taux de perfusion (Ab) avec les oscillations lentes de réseau (SNOs pour « Slow Network Oscillations ») induites par le blocage pharmacologique des transporteurs au glutamate EEAT avec le DL-TBOA (données non publiées de L. Aniksztejn & A.A. Cattani).

2. Fonctions possibles du premier patron d'activité neuronale corrélée du cortex en développement, le SPA

2.1 Un rôle dans la maturation synaptique ?

Un point de départ qui nous semble important dans l'étude de la fonction des SPAs est la question du devenir des neurones exprimant cette forme d'activité électrique. En effet, si les cellules impliquées dans les SPAs étaient transitoirement présentes avant de disparaître au cours du développement, notre hypothèse concernant la fonction des SPAs s'orienterait également vers une fonction transitoire comme par exemple, celle des cellules Cajal-Retzius de la couche I (Frotscher et al., 2009) ou celle des cellules pionnières GABAergiques de l'hippocampe (Jiang et al., 2001). Cependant nos données indiquent au contraire que la majorité des cellules SPAs persistent et intègrent le patron d'activité neuronale corrélée suivant, les GDPs.

Pour répondre à la question du destin des cellules SPAs nous avons adapté notre protocole d'imagerie calcium habituel, spécifique des tranches d'hippocampe aigues, pour les tranches organotypiques d'hippocampe, qui permettent de suivre un même réseau de cellules d'un jour à l'autre. Une telle approche nous a permis de découvrir que la majorité des cellules SPAs intègrent les GDPs, patron d'activité neuronale corrélée succédant aux SPAs et premier patron porté par la transmission synaptique au sein de l'hippocampe en développement. De plus, de précédentes études ont montré que la mise en place des synapses au niveau de l'hippocampe s'étendait entre la fin de la période embryonnaire et les premiers jours de vie postnatale chez le rongeur (Tyzio et al., 1999 ; Hennou et al., 2002), avec 78 % des interneurones exprimant des synapses GABAergiques et glutamatergiques à la naissance (Hennou et al., 2002). L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'activité SPA jouerait un rôle dans la mise en place des synapses vers l'intégration d'un neurone au sein du réseau synaptique. Une importante caractéristique morpho-physiologique des interneurones SPA pourrait indirectement soutenir cette hypothèse. En effet, le corps cellulaire des interneurones SPAs présente des filopodes. Or, plusieurs études ont montré que les filopodes sont un lieu de synaptogenèse (Fiala et al., 1998; Jontes and Smith, 2000; Portera-Cailliau and Yuste, 2001; Wong and Wong, 2001; Ziv and Smith, 1996). Nous avons également montré que ces interneurones SPAs possèdent des courants GABA et AMPA post-synaptiques miniatures de grande amplitude contrairement aux interneurones GDPs. Nous suggérons que l'occurrence fréquente de courants

miniatures géants concernant les interneurones SPA, peut être corrélée à la présence de filopodes somatiques (voir discussion du résultat II). En effet, les courants générés au niveau des filopodes somatiques subiraient moins de filtrage électrotonique, atténuant leur amplitude, que ceux générés sur les dendrites distales. Ainsi nos données concernant le devenir et les spécificités morpho-physiologiques des SPAs nous permettent d'émettre l'hypothèse que cette activité jouerait un rôle dans la formation des synapses et l'intégration au réseau. Nous allons voir maintenant que ce rôle possible des SPAs dans la formation des synapses, pourrait être en partie permis par le niveau d'excitabilité neuronale imposé par les SPAs.

Une étude récente étudiant l'intégration de neurones nouvellement générés au sein de circuits matures (Lin et al., 2010) compare le rôle dans ce processus, des patrons d'activité neuronale à celui d'une simple augmentation du niveau global de dépolarisation membranaire. Pour augmenter le niveau de dépolarisation membranaire des progéniteurs neuronaux du cerveau adulte, les auteurs utilisent des vecteurs rétroviraux induisant l'expression de canaux sodium bactériens (NaChBac) au sein de ces progéniteurs. Ces canaux vont perturber l'activité des neurones en augmentant parallèlement leur niveau de dépolarisation membranaire. De manière surprenante, une telle manipulation induit une activité électrique spontanée similaire à celle des SPAs. En effet, le tracé électrophysiologique en mode courant imposé, au potentiel de repos, des cellules NaChBac+, présente de larges dépolarisations récurrentes du potentiel membranaire avec quelques potentiels d'actions au début du sommet de chaque dépolarisation (Lin et al., 2010, figure 2.E). Un tel tracé est en tout point similaire au corrélat électrophysiologique des SPAs. Une telle similarité peut être interprétée de deux manières opposées. La première est qu'en introduisant des NaChBac dans les cellules, les auteurs de cette étude induisent un patron spécifique : le SPA, au lieu d'augmenter simplement l'excitabilité neuronale. L'effet produit serait alors contraire à leur objectif et les conclusions de ces types d'études qui manipulent l'activité neuronale, dans le sens d'une augmentation de l'excitabilité, devraient être considérées avec précaution.

La deuxième interprétation est, qu'au contraire, le SPA ne serait pas un patron spécifique du développement mais une simple augmentation spontanée et transitoire de l'excitabilité neuronale. Cependant, par définition, le SPA est une activité de réseau organisée et possède un profil développemental et un devenir qui le place au sein d'une séquence développementale de patrons d'activité de réseau, excluant la deuxième possibilité. Toutefois, cette étude indiquerait que le SPA est un patron d'activité neuronale dont la

particularité est le niveau élevé d'excitabilité et confirmerait leur fonction de synaptogenèse pour l'intégration des neurones au sein du réseau.

2.2. Le SPA : un mécanisme de compensation en cas de déficit de l'excitabilité neuronale, nécessaire au cours du développement ?

La similarité entre l'activité des cellules impliquées dans les SPAs et l'activité des cellules NaChBac+ nous indique-t-elle que les cellules SPAs possèdent une densité de courants sodiques voltage-dépendants élevée ? il est difficile de répondre à cette question puisqu'il a été montré que des patrons d'activité neuronale intrinsèque similaires peuvent provenir de combinaisons variées de densité de conductances membranaires (pour revue : Marder and Goaillard, 2006). Il semble que cette règle s'applique particulièrement pour l'activité de type SPA puisque de manière surprenante, la manipulation contraire à l'introduction de canaux sodiques pour augmenter l'excitabilité, qui consiste à introduire des canaux potassiques non-rectifiants (Kir2.1) pour diminuer l'excitabilité neuronale, induit également un patron d'activité de type SPA au cours de la première semaine postnatale au sein des cellules de l'hippocampe (donnée non publiée, récemment obtenue au laboratoire par l'équipe d'Alfonso Represa). Cet effet n'est cependant plus observé dès la fin de la première semaine postnatale, c'est-à-dire que la survenue de SPA au sein de cellules exprimant une forte densité de canaux Kir2.1 est transitoire ; après le stade du SPA, les cellules Kir2.1+ sont effectivement hyperpolarisées et moins actives, elles ne présentent plus les larges dépolarisations membranaires récurrentes similaires à celles des cellules SPAs. Par quel mécanisme l'introduction expérimentale d'un des deux types de canaux ioniques différents, les canaux sodium NaChBac et les canaux potassium Kir2.1, dont l'activation engendre en principe une action opposée : respectivement une dépolarisation et une hyperpolarisation du potentiel membranaire, induit-elle dans les deux cas une augmentation de l'excitabilité intrinsèque neuronale, mimant l'activité SPA ? La dépolarisation membranaire des neurones en développement étant primordiale pour leur survie et leur intégration synaptique au sein du réseau (Ben-Ari et al., 2007; Lin et al., 2010), une hyperpolarisation imposée et prolongée telle que l'introduction expérimentale de canaux Kir2.1, pourrait induire un mécanisme de plasticité, tel qu'un mécanisme de compensation de la gamme des conductances exprimée par le neurone, générant ainsi le patron d'activité neuronale souhaité (Marder and Goaillard, 2006); ici un patron d'excitabilité avec dépolarisations membranaires récurrentes, similaire au SPA. Il est également possible que l'hyperpolarisation induite par l'expression de Kir2.1

soit favorable à l'activation d'autres conductances (par exemple le courant I_h) elles-mêmes impliquées dans la genèse des oscillations membranaires de type SPA (Crepel et al., 2007).

2.3 Un rôle dans la mort neuronale programmée du développement ?

D'après nos résultats préliminaires il est possible que la minorité de cellules SPAs qui n'intègre pas le réseau synaptique des GDPs déclenchent un programme d'apoptose.

Si ce résultat se confirmait, l'ambivalence du devenir des cellules SPAs : *i.e.* intégration au réseau synaptique versus mort cellulaire programmée, s'inscrit parfaitement dans le cadre prévu par les règles générales du développement (Banks et al., 2005;Buss et al., 2006;Davies, 2003;Galli-Resta and Resta, 1992;Katz and Shatz, 1996;Linden, 1994;Oppenheim et al., 1991;Posada and Clarke, 1999;Sendtner et al., 2000): parmi le grand nombre de neurones produit, seront éliminés ceux dans l'incapacité de se connecter de manière stable à leur cible spécifique.

Nous pouvons proposer un mécanisme qui orienterait le devenir des cellules SPAs vers l'intégration ou vers la mort: l'activité spontanée des cellules SPAs consiste en une entrée massive de calcium via les canaux calciques de type L (Allene et al., 2008;Crepel et al., 2007) qui peut déclencher une cascade de signaux intracellulaires dont les conséquences peuvent être, elles aussi, ambivalentes. En effet, plusieurs études ont montré qu'une variation de calcium intracellulaire pouvait déclencher un programme de mort neuronale (Cano-Abad et al., 2001;Kim et al., 2008;Lee et al., 1993;Luo et al., 2005;Ueda et al., 1997) ou, au contraire, permettre la croissance dendritique et la survie neuronale (Hardingham and Bading, 2003;Konur and Ghosh, 2005;Lohmann and Wong, 2005;Neal et al., 2010;Redmond et al., 2002;Wayman et al., 2006;Wong and Ghosh, 2002). Il est probable que la conséquence du signal calcium dépende de sa durée et de ses caractéristiques spatio-temporelles (Berridge et al., 1998). L'apoptose est déclenchée par une entrée de calcium massive et soutenue (Cano-Abad et al., 2001;Kim et al., 2008;Lee et al., 1993;Luo et al., 2005;Ueda et al., 1997) qui pourrait être transmise par les canaux calcium de type L (Cano-Abad et al., 2001;Kim et al., 2008;Lee et al., 1993;Luo et al., 2005;Ueda et al., 1997). D'autres études ont rapporté que l'activation des canaux calcium de type L peut également induire l'activation du facteur de transcription CREB, permettant au contraire la croissance dendritique et la survie neuronale (Guido, 2008;Jiang and Swann, 2005;Marini et al., 2004;Redmond et al., 2002;West et al., 2001). Ainsi, les caractéristiques des oscillations calciques soutenues des cellules SPAs leur

permettraient de développer des filopodes dendritiques, peut être pour sonder les axones environnants en vue de former des synapses nécessaires à leur intégration au sein du réseau synaptique (Dillon and Goda, 2005;Niell et al., 2004;Zheng and Poo, 2007;Ziv and Smith, 1996). S'il se crée un nombre insuffisant de contacts stables entre une cellule SPA et les autres neurones du réseau, les oscillations calcium soutenues persistent et déclenchent un programme apoptotique (Cano-Abad et al., 2001;Kim et al., 2008;Lee et al., 1993;Luo et al., 2005;Ueda et al., 1997). Au contraire, si les cellules SPAs effectuent des connexions stables et participent aux GDPs comme nous l'avons montré ici (voir la partie résultat II), la durée des plateaux calciques va diminuer progressivement, comme précédemment montré dans l'équipe (Crepel et al., 2007) et le signal calcium atteindra alors un niveau qui permettrait la conversion des filopodes en branches dendritiques (Portera-Cailliau and Yuste, 2001;Portera-Cailliau et al., 2003;Sotelo and Dusart, 2009;Vaughn, 1989), la formation des synapses et la survie neuronales (Guido, 2008;Jiang and Swann, 2005;Marini et al., 2004;Redmond et al., 2002;West et al., 2001). Tout ceci est bien évidemment encore très spéculatif. Ces effets des GDPs et des changements intracellulaires de calcium de plus faible amplitude qu'ils produisent sur les cellules SPAs, pourraient agir via l'activation du facteur de transcription CREB et/ou via la suppression de plusieurs molécules clés de la voie apoptotique. (Ben-Ari et al., 2007;Fields et al., 1990;Fiorentino et al., 2009;Hong et al., 2008;Huang and Scheiffele, 2008;Katz and Shatz, 1996;Leveille et al., 2010;Owens et al., 1996;Papadia et al., 2005). Plusieurs études montrent que l'activité glutamatergique régule la survie neuronale et la différentiation morphologique (Choi and Rothman, 1990;de Lima et al., 2004;McDonald and Johnston, 1990), ici nous proposons que l'activité GABAergique au cours des GDPs pourrait également réguler la survie neuronale et la différentiation morphologique, en évitant aux cellules SPAs qui s'intègrent au sein de ce réseau synaptique, de déclencher un signal d'apoptose, et en permettant la maturation de leurs propriétés morpho-physiologiques.

2.4. Un rôle dans la fin de la migration neuronale ?

Nous avions montré que les GDPs, activité synaptique synchrone, marquait la fin de l'activité SPA, activité intrinsèque non-synaptique et que la suppression pharmacologique des GDPs restaurait les SPAs au cours de la première semaine postnatale (Allene et al., 2008;Crepel et al., 2007). Or, Voigt et ses collaborateurs ont montré que l'apparition de l'activité synaptique synchrone marquait la fin de la migration neuronale et que le blocage de l'activité synaptique

restaurait la migration au sein du réseau néocortical (de Lima et al., 2009). Il est donc possible que l'activité SPA soit exprimée spécifiquement au sein des neurones en fin de migration. De façon intéressante, deux études ont montré récemment que la migration des interneurones GABAergiques prenait fin au cours des premiers jours suivant la naissance (Bortone and Polleux, 2009; Miyoshi and Fishell, 2010), correspondant au stade d'expression des SPA dans les interneurones. Ces auteurs ont aussi montré que la fin de la migration des interneurones coïncidait avec une augmentation concernant leur densité de co-transporteurs KCC2, responsable de l'expulsion du chlore en dehors des neurones (Bortone and Polleux, 2009; Miyoshi and Fishell, 2010). Plus particulièrement, Bortone et Polleux ont montré que l'augmentation de la densité des co-transporteurs KCC2 qui survient spécifiquement au sein des interneurones en fin de migration, était à la fois nécessaire et suffisante pour réduire la mobilité des interneurones, à travers sa capacité à réduire la dépolarisation membranaire induite par l'activation du récepteur GABA_A, causant ainsi une diminution de la fréquence des évènements calcium intracellulaires spontanés dépendant de l'activation des canaux calcium voltage-dépendants de type L (Bortone and Polleux, 2009). Or, de la même façon que pour les interneurones en migration, la concentration de chlore intracellulaire et l'activation des canaux calciques de type L, régulent l'expression de l'activité SPA (Allene et al., 2008; Crepel et al., 2007). En effet, le blocage des canaux calcium de type L supprime l'activité SPA et le blocage pharmacologique par le bumétanide du co-transporteur du chlore NKKCI, dont la fonction est de faire entrer le chlore dans les neurones, est favorable à l'expression de l'activité SPA aux stades embryonnaires (Allene et al., 2008; Crepel et al., 2007). De façon spéculative, nous pouvons supposer que l'activité SPA soit préférentiellement exprimée au sein de neurones dont la concentration de chlore intracellulaire est plus basse que celle des autres neurones du réseau, de manière similaire aux interneurones en fin de migration (Bortone and Polleux, 2009; Miyoshi and Fishell, 2010). Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que l'activité de type SPA serait exprimée par les neurones venant d'achever leur migration, pour lesquels l'intégration au sein d'un réseau synaptique signerait la fin à la fois de l'activité SPA (Crepel et al., 2007) et de la migration (de Lima et al., 2009). Toutefois la validation expérimentale de cette hypothèse requière la détermination précise du potentiel d'équilibre du chlore par des méthodes non invasives (Tyzio et al., 2008) ainsi que l'immuno-marquage de l'expression de la protéine KCC2.

Plusieurs hypothèses concernant la fonction et le mécanisme des SPAs, sont émises tout au long de cette discussion. Cependant aucune n'exclue les autres, au contraire, toutes pourraient être liées : on peut en effet imaginer que le SPA s'exprime au sein de neurones en fin de migration et crée des conditions propices à leur intégration au sein du réseau synaptique sous-tendant la genèse des GDPs, telles qu'un niveau élevé d'excitabilité neuronale et la croissance de protrusions somatiques. L'échec d'une telle intégration conduirait les neurones SPA à déclencher un signal de mort cellulaire programmée (figure 3).

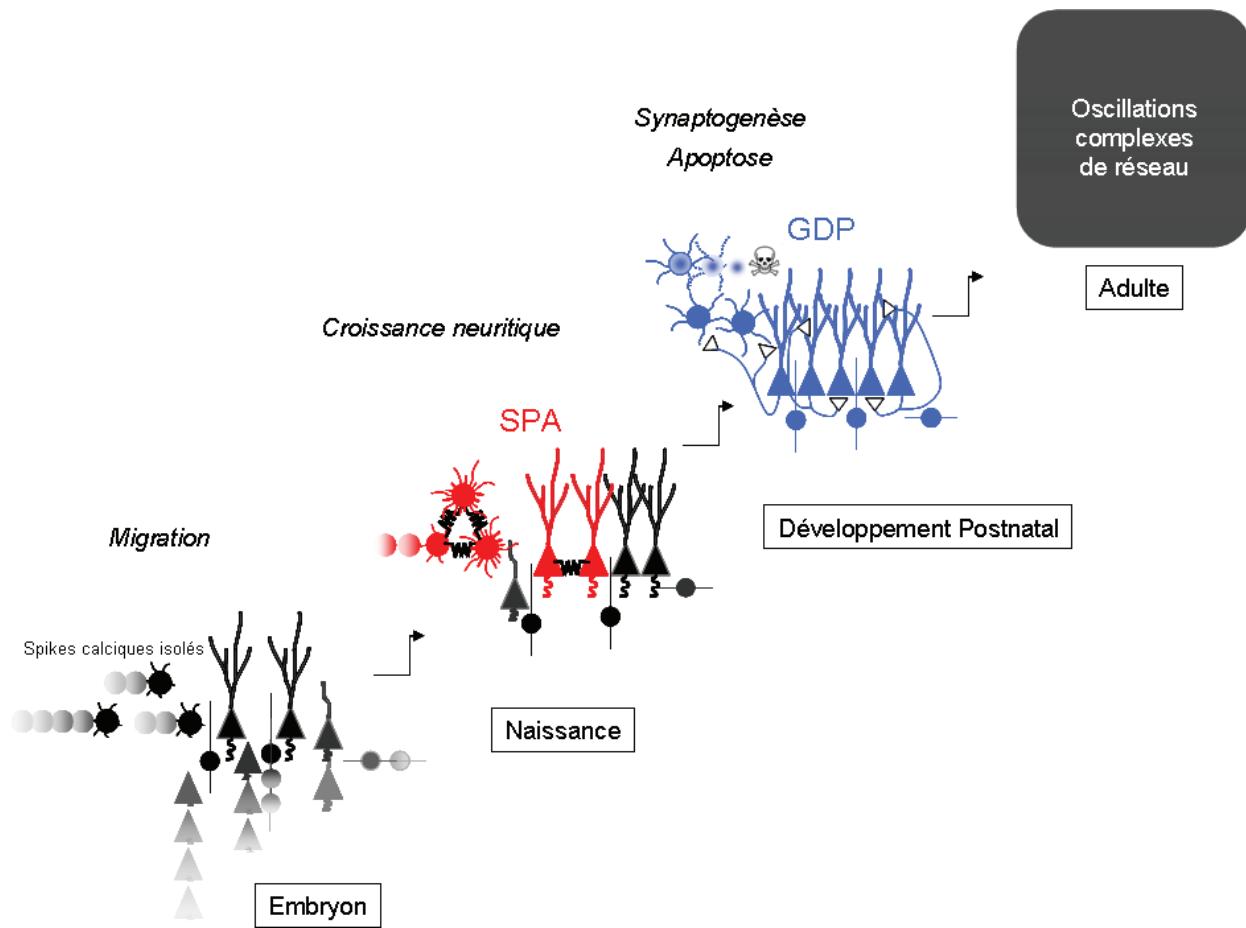


Figure 3 : Spéculation sur le rôle possible de l'activité SPA dans la maturation des microcircuits corticaux. Représentation schématique des étapes de maturation supposées des cellules qui expriment l'activité SPAs au moment de la naissance, en fonction de la maturation du réseau cortical.

Au stade embryonnaire, l'activité neuronale n'est pas corrélée, elle est constituée de spikes calcium sporadiques. Les interneurones, dont les corps cellulaires sont représentés par des ronds et les cellules pyramidales, dont les corps cellulaires sont représentés par des triangles, sont en cours de migration, le sillage migratoire est représenté par les dégradés de gris.

Au moment de la naissance et au cours des premiers jours suivants, les neurones, venant d'achever leur migration, expriment l'activité SPA (représentée en rouge) via leur interconnexion par des jonctions gap et possèdent, au moins en ce qui concerne les interneurones SPA, des filopodes somatiques, qui leur permettraient de sonder l'environnement à la recherche d'axones des cellules voisines, afin de former des connexions synaptiques. Cette étape du développement est marquée par le processus de croissance neuritique. A la fin de la première semaine postnatale, la plupart des neurones qui exprimaient l'activité SPA ont intégré le réseau synaptique des GDPs (représentés en bleu) et n'ont plus de filopodes somatiques. Les neurones SPAs qui auraient échoué à intégrer le réseau synaptique des GDPs, déclenchaient un programme de mort cellulaire programmée. Ce stade du développement est marqué par la synaptogenèse et l'apoptose.

Perspectives

Au cours de ce travail, les connaissances concernant les trois patrons d'activité neuronale corrélée des réseaux corticaux en développement, SPAs, ENOs et GDPs ont été approfondies. En effet, les GDPs, bien décrits dans le laboratoire au sein de l'hippocampe (Ben Ari et al., 1989), ont été ici décrits au sein du néocortex et confrontés aux ENOs, précédemment considérées comme étant l'homologue cortical des GDPs de l'hippocampe. Par ailleurs, les ENOs étaient également considérées comme un patron d'activité spontané et physiologique du développement. Or, cet aspect est remis en question ici avec la découverte de leur sensibilité critique face aux accumulations pathologiques de glutamate. Enfin, les SPAs, tout juste mis en évidence dans l'équipe au début de ma thèse, ont été davantage étudiés, en particulier concernant leur devenir au cours de la première semaine postnatale et leurs propriétés morpho-physiologiques.

Lors de la discussion, j'ai proposé plusieurs fonctions possibles à cette activité SPA. Certaines d'entre elles constituent un sujet d'étude en perspective. Pour commencer, je souhaiterai vérifier l'hypothèse du rôle de l'activité SPA dans la maturation synaptique. Dans ce but, j'utiliserai la microscopie électronique, afin de vérifier l'existence de synapses et leur type : symétrique (inhibitrice) et/ou asymétrique (excitatrice) au niveau des filopodes somatiques des SPAs. Idéalement, je souhaiterais aussi effectuer l'imagerie à fort grossissement au niveau des filopodes somatiques en utilisant un protocole de time lapse afin de suivre en imagerie la mise en place éventuelle d'un contact synaptique en parallèle de l'activité SPA. Si cette expérience aboutit, nous obtiendrions un argument direct en faveur d'un rôle des SPAs dans la synaptogenèse.

Par ailleurs, j'aimerais comprendre si les SPAs sont exprimés par toutes les familles morphofonctionnelles d'interneurones GABAergiques ou seulement par un sous-type particulier. Cette question est importante puisqu'elle permettrait de préciser davantage la fonction du SPA. En effet, si les SPAs sont exprimés par un sous-type d'interneurones particulier dont la maturation et / ou la fonction ont été précédemment décrites, comme c'est le cas pour le groupe des « basket cells fast spiking » (Bartos et al., 2002;Canty et al., 2009;David et al., 2007;Daw et al., 2007;Doischer et al., 2008;Okaty et al., 2009;Sohal et al., 2009;Woodruff and Sah, 2007), l'étude de la fonction du SPA en serait grandement facilité. Cependant, les propriétés neuronales matures, qui permettent d'identifier les différents sous-types d'interneurones, ne s'expriment qu'à des stades tardifs du développement, bien après le stade des SPAs. L'utilisation de la technique de « fate mapping » (Batista-Brito and Fishell,

2009;Miyoshi and Fishell, 2006) permettrait de contourner cette limitation. En effet, le « fate mapping » permet de marquer un sous-type d'interneurone en fonction de son lieu et jour de naissance (Batista-Brito and Fishell, 2009;Miyoshi and Fishell, 2006) et donc de visualiser les neurones appartenant au sous-type ciblé dès leur genèse. Ainsi, je souhaiterais pouvoir utiliser cette technique au cours du post-doctorat, afin de répondre à la question primordiale du phénotype des cellules SPA.

Annexes

Article in press

Depolarizing actions of GABA in immature neurons depend neither on ketone bodies nor on pyruvate.

R Tyzio, C Allene, R Nardou, MA Picardo, S Yamamoto, S Sivakumaran, MD
Caiati , S Rheims, M Minlebaev, M Milh, P Ferré, R Khazipov, JL Romette, J
Lorquin, R Cossart, I Khalilov, A Nehlig, E Cherubini, Y Ben-Ari I

Cellular/Molecular

Depolarizing Actions of GABA in Immature Neurons Depend Neither on Ketone Bodies Nor on Pyruvate

Roman Tyzio,¹ Camille Allene,¹ Romain Nardou,¹ Michel A. Picardo,¹ Sumii Yamamoto,¹ Sudhir Sivakumaran,² Maddalena D. Caiati,² Sylvain Rheims,¹ Marat Minlebaev,¹ Mathieu Milh,¹ Pascal Ferré,³ Rustem Khazipov,¹ Jean-Louis Romette,⁴ Jean Lorquin,⁵ Rosa Cossart,¹ Ilgam Khalilov,¹ Astrid Nehlig,⁶ Enrico Cherubini,² and Yehezkel Ben-Ari¹

¹Inserm, Unité 901/Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, 13273 Marseille, France, ²Neurobiology Department, International School for Advanced Studies, 34012 Basovizza (Trieste), Italy, ³Inserm, Unité Mixte de Recherche S872, Centre de Recherche des Cordeliers and Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, 75006 Paris, France, ⁴Ecole Supérieur d'Ingénieurs de Luminy, Case 925, 13288 Marseille, France, ⁵Institut de Recherche pour le Développement, Microbiologie et Biotechnologie des Environnements Extrêmes, Unité Mixte de Recherche D180, Université de Provence et de la Méditerranée, 13288 Marseille, France, and ⁶Inserm, Unité 666, Faculty of Medicine, 67085 Strasbourg, France

AQ: A

GABA depolarizes immature neurons because of a high $[Cl^-]_i$ and orchestrates giant depolarizing potential (GDP) generation. Zilberter and coworkers (Rheims et al., 2009; Holmgren et al., 2010) showed recently that the ketone body metabolite DL-3-hydroxybutyrate (DL-BHB) (4 mM), lactate (4 mM), or pyruvate (5 mM) shifted GABA actions to hyperpolarizing, suggesting that the depolarizing effects of GABA are attributable to inadequate energy supply when glucose is the sole energy source. We now report that, in rat pups (postnatal days 4–7), plasma D-BHB, lactate, and pyruvate levels are 0.9, 1.5, and 0.12 mM, respectively. Then, we show that DL-BHB (4 mM) and pyruvate (200 μ M) do not affect (i) the driving force for GABA_A receptor-mediated currents (DF_{GABA}) in cell-attached single-channel recordings, (2) the resting membrane potential and reversal potential of synaptic GABA_A receptor-mediated responses in perforated patch recordings, (3) the action potentials triggered by focal GABA applications, or (4) the GDPs determined with electrophysiological recordings and dynamic two-photon calcium imaging. Only very high nonphysiological concentrations of pyruvate (5 mM) reduced DF_{GABA} and blocked GDPs. Therefore, DL-BHB does not alter GABA signals even at the high concentrations used by Zilberter and colleagues, whereas pyruvate requires exceedingly high nonphysiological concentrations to exert an effect. There is no need to alter conventional glucose enriched artificial CSF to investigate GABA signals in the developing brain.

Introduction

Fn1

GABA depolarizes and excites immature neurons in many animal species because of their higher $[Cl^-]_i$ compared with mature neurons. This developmental change reflects the sequential operation of the chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 (Ben-Ari et al., 1989; Owens et al., 1996; Rivera et al., 1999; Ganguly et al., 2001; Akerman and Cline, 2006) (for review, see Ben-Ari, 2002; Owens and Kriegstein, 2002; Ben-Ari et al., 2007). GABAergic synapses are expressed before glutamatergic synapses, and GABA provides most of the early activity and orchestrates the generation of the first synaptic network-driven giant depolarizing potentials (GDPs) (Ben-Ari et al., 1989; Garaschuk et al., 1998;

Tyzio et al., 1999; Ben-Ari, 2001; Sipila et al., 2006; Crépel et al., 2007; Bonifazi et al., 2009).

Rodent maternal milk is enriched in fatty acids that are transformed in the liver to aceto-acetate and DL-3-hydroxybutyrate (DL-BHB). On the basis of this information, Zilberter and colleagues have recently challenged the developmental sequence of GABA action (Rheims et al., 2009) and reported that adding DL-BHB (4 mM) to artificial CSF (ACSF) almost completely eliminated depolarizing and excitatory actions of GABA. This was suggested to reflect the actions of the Cl^-/HCO_3^- exchanger and not KCC2, reported to be inactive in the neocortex at the ages investigated [postnatal day 1 (P1) to P8] (Rheims et al., 2009). In a subsequent paper, the same group (Holmgren et al., 2010) extended these observations to hippocampal CA3 pyramidal neurons and reported that, in addition to DL-BHB, lactate or pyruvate at exceedingly high concentrations (5 mM) also shifted reversal potential of synaptic GABA_A receptor (GABA_AR)-mediated responses (E_{GABA}) and blocked GDPs, suggesting that the depolarizing actions of GABA are attributable to energy deprivation when glucose is the sole energetic source. Because this suggestion has important implications for neonatal slice studies, we have now reexamined the effects of DL-BHB and pyruvate on GABA actions on neonatal deep layers neocortical neurons and CA3 pyramidal neurons.

Received June 27, 2010; revised Sept. 14, 2010; accepted Sept. 20, 2010.

This work was supported by Inserm, L'Agence Nationale de la Recherche (I.N.R.), Fédération pour la Recherche sur le Cerveau, European Union Network of European Museum Organisations, Fondation pour la Recherche Médicale, and Ministero Istruzione, Università e Ricerca to interface contract with Paris V University (Y.B.-A.). We are grateful to Drs. K. Kaila, P. Legendre, N. Burnashev, G. Chazal, and I. Medina for suggestions and critical remarks. We are grateful to Drs. L. Aniksztejn, F. Libersat, I. Bureau, and J. Epsztein for supervision of the results obtained by the Institut de Neurobiologie de la Méditerranée teams.

Correspondence should be addressed to Yehezkel Ben-Ari, Inserm, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Unité 901, Campus Scientifique de Luminy 163, route de Luminy BP13, 13009 Marseille, France. E-mail: ben-ari@inmed.univ-mrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3314-10.2011

Copyright © 2011 the authors 0270-6474/11/310001-12\$15.00/0

AQ: B

AQ: C

We report that physiological plasma levels of D-BHB, lactate, and pyruvate are in pups (P5–P7) 0.9, 1.5, and 0.12 mM, respectively. Then, using a wide range of techniques that include extracellular field potential, cell-attached single-channel, and perforated patch-clamp recordings and calcium imaging we report that neither DL-BHB (Sigma-Aldrich) nor physiological concentrations of pyruvate alter GABA actions or spontaneous network dynamics, notably GDPs on rat neocortical and hippocampal neurons. Only very high nonphysiological concentrations of pyruvate altered GABA signaling and GDPs. Our results suggest that depolarizing GABA and GDPs are attributable to neither the absence of BHB/pyruvate nor the metabolic state of neurons in glucose-containing ACSF.

Materials and Methods

All investigations were analyzed in a double-blind manner with results obtained by an investigator analyzed by another researcher. In addition, this study was supervised by an independent group of Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED) principle investigators that were not involved in research on GABA in the developing brain (see Acknowledgments). They critically reviewed the results that were discussed in internal meetings of all INMED researchers.

Endogenous plasma D-BHB, lactate, and pyruvate

For D-BHB determination, plasma of pups was first deproteinized using 6% (w/v) perchloric acid and centrifuged, and the supernatant was neutralized with KOH before enzymatic determination. D-BHB was determined enzymatically using the spectrophotometric procedure as described previously (Ferré et al., 1983). Dosage of serum lactate and pyruvate were done in the metabolic biochemistry laboratory of Timone Hospital (Marseille, France). Enzymatic technique was used for lactate (RAPIDLAB 1265). Enzymatic dosage based on the reduction of pyruvate to lactate by the lactate dehydrogenase at pH 7.5 with excess nicotinamide adenine dinucleotide was used for the dosage of pyruvate (Vassault, 1991).

Brain slices

Brain slices were prepared from P4–P8 Wistar rats of both sexes. All animal use protocols conformed to the national guidelines on the use of laboratory animals and were approved by the Animal Care and Use Committees of Inserm and International School for Advanced Studies. Animals were rapidly decapitated, and brains were removed. Coronal slices (300–500 μ m) were cut using a tissue slicer (Leica-VT1200S; Microm International) in ice-cold oxygenated modified ACSF with 0.5 mM CaCl₂ and 7 mM MgSO₄, in which Na⁺ was replaced by an equimolar concentration of choline. Slices were then transferred to oxygenated (95% O₂/5% CO₂) standard ACSF containing the following (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 2.0 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, and 10 glucose, pH 7.4, at room temperature (20–22°C) for at least 1 h before use. For recordings, slices were placed into a conventional, fully submerged chamber superfused with ACSF (32–34°C) at a rate of 2–3 ml/min.

Perforated patch-clamp and whole-cell recordings

Patch-clamp recordings were performed from neocortical pyramidal and CA3 pyramidal neurons using EPC-10 Double (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) and Axopatch 200A (Molecular Devices) amplifiers. Patch electrodes were made from borosilicate glass capillaries (GC150F-15; Clark Electromedical Instruments). Patch pipette solution for gramicidin perforated patch-clamp recording contained the following (in mM): 150 KCl and 10 HEPES, buffered to pH 7.2 with Tris-OH. Gramicidin was first dissolved in DMSO to prepare a stock solution of 10–40 mg/ml and then diluted in the pipette solution to a final concentration of 80 μ g/ml. The gramicidin-containing solution was prepared and sonicated <1 h before the experiment. To facilitate cell-attached formation (4–10 G Ω), patch pipettes were backfilled with a gramicidin-containing solution. Between 20 and 30 min after formation of the cell-attached seal, the series resistance (R_s) stabilized at 8–60 M Ω . Series resistance was monitored during all recording sessions. At the end of each recording,

negative pressure was applied to break the membrane and establish whole-cell configuration. This was associated with a shift of the reversal potential of the GABA-mediated responses to near 0 mV. The membrane potential values (E_m) were corrected for series resistance offline as $V(\text{corrected}) = V(\text{holding}) - IR_s$. For whole-cell recordings, we used the pipette solution containing the following (in mM): 135 K-gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 4 MgATP, 0.3 GTP, and 0.5 EGTA. A picospritzer (General Valve Corporation) was used to puff apply GABA (100 μ M in ACSF) from a glass pipette in stratum radiatum at a distance of ~100 μ m from the soma in gramicidin perforated patch recordings. The pressure varied from 10 to 20 kPa, and the duration of the puff varied from 50 to 200 ms.

Cell-attached recordings of GABA_A and NMDA receptor channels

Patch-clamp recordings from visually identified pyramidal cells in a cell-attached configuration were performed using an EPC-10 double amplifier or Axopatch 200B amplifier. For recordings of single GABA channels, the following patch pipette solution was added on the day of the experiment from a 1 mM frozen stock solution (in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 20 tetraethylammonium-Cl, 5 4-aminopyridine, 0.1 CaCl₂, 10 MgCl₂, 10 glucose, and 10 HEPES-NaOH, buffered to pH 7.2–7.3 (with GABA at 1–5 μ M). E_m was estimated using cell-attached recordings of single NMDA receptor (NMDAR) channels as described previously (Tyzio et al., 2003). For recordings of single NMDAR channels, pipette solution contained nominally Mg²⁺-free ACSF with NMDA (10 μ M), glycine (1 μ M), and strychnine (1 μ M). Pipettes (resistance of 3.5–8 M Ω) were pulled from borosilicate glass capillaries (GC150F-15; Clark Electromedical Instruments). Recordings were digitized (10 kHz) online with Digidata 1200 or 1440 interface cards (Molecular Devices), filtered (2.9 kHz), and analyzed offline with Axon package (Molecular Devices) and Origin (Microcal Software) as described previously (Tyzio et al., 2003, 2006). Group measures are expressed as means \pm SEM; error bars also indicate SEM. The statistical significance of differences was assessed with Student's *t* test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Calcium imaging

Slice preparation for calcium imaging. Horizontal slices of neocortex and hippocampus (400 μ m thick) were prepared from P7 rats using a Vibratome tissue slicer (Leica VT 1200S) in ice-cold oxygenated modified ACSF (mACSF) (with 0.5 mM CaCl₂ and 7 mM MgSO₄; NaCl replaced by an equimolar concentration of choline). Slices were then transferred for rest (~1 h) in oxygenated normal ACSF containing the following (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1.3 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, and 10 D-glucose, pH 7.4. For AM loading, slices were incubated in a small vial containing 2.5 ml of oxygenated ACSF with 25 μ l of a 1 mM fura-2 AM solution (in 100% DMSO; Invitrogen) for 20–30 min. Slices were incubated in the dark, and the incubation solution was maintained at 35–37°C. Slices were perfused at a rate of 4 ml/min with continuously aerated (95% O₂/5% CO₂) normal ACSF at 35–37°C. Imaging was performed with a multibeam two-photon laser scanning system (Trimscope-LaVision Biotech) coupled to an Olympus microscope as described previously (Crépel et al., 2007). Images were acquired through a CCD camera (La Vision Imager 3QE), which typically resulted in a time resolution of ~100 ms (2 \times 2 binning; pixel size, 600 nm). Slices were imaged using a low-magnification, high numerical aperture objective (20 \times , numerical aperture 0.95; Olympus). The size of the imaged field was typically 430 \times 380 μ m². Imaging depth was on average 80 μ m below the surface (range, 50–100 μ m).

Analysis of multineuron calcium activity. Analysis of the calcium activity was performed using a previously designed software for neocortical and hippocampal slice analysis (Allène et al., 2008). To summarize briefly, this allowed (1) automatic identification of loaded cells, (2) measuring the average fluorescence transients from each cell as a function of time, and (3) detecting the onsets and offsets of calcium signals. To quantify synchronous activity patterns, we used two parameters: frequency and amplitude and duration of synchronous events. The frequency of a network pattern was derived from the average time interval between two peaks of synchronous activity. The amplitude of a network pattern in a given movie was the average of the maximum of cells coactive in each peak of synchrony across the movie. To identify peaks of synchro-

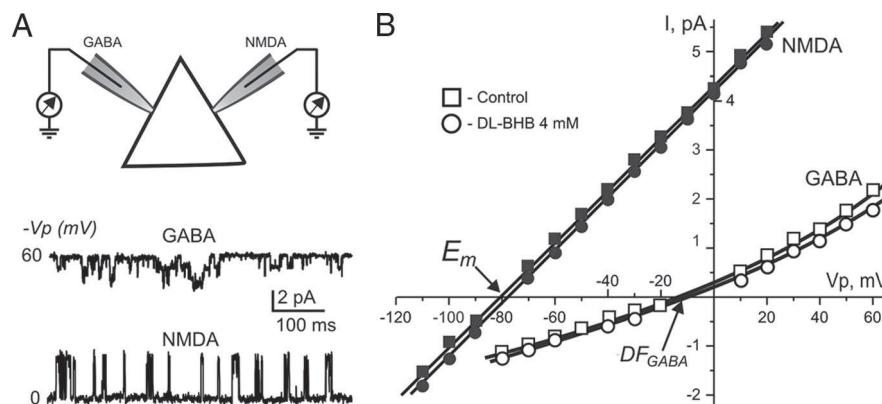


Figure 1. Estimation of E_{GABA} by double recordings of DF_{GABA} and E_m from the same neocortical cell. **A**, Scheme of consecutive cell-attached recordings of single NMDAR and GABA_AR channels. First we recorded from the same neuron in control conditions for NMDAR channels (for E_m) and then GABA_AR channels (for DF_{GABA}). These two measurements allow us to determine E_{GABA} for this neuron. Then, we applied DL-BHB for 40 min and repeated the recordings with the same sequence (NMDAR and then GABA_AR channels). Thus, every cell studied was patched four times. Representative traces of recordings of the single-channel openings are shown below. **B**, Representative plot of I - V relationships of single GABA_AR and NMDAR channels used for estimation of E_{GABA} in neocortical pyramidal cell ($E_{GABA} = DF_{GABA} + E_m$). Each point is mean amplitude of ~ 30 openings at a given pipette potential (V_p). The reversal potential that corresponds to DF_{GABA} was estimated by the exponential growth fit of the I - V curve. The current-voltage relationships of NMDAR channels were best fitted with linear function (Tyzio et al., 2003, 2008). Note that application of DL-BHB does not change significantly DF_{GABA} and E_m .

nous activity that included more cells than expected by chance, we used interval reshuffling (randomly reordering of intervals between events for each cell) to create set of surrogate event sequences. Reshuffling was performed 1000 times for each movie, and a surrogate histogram was constructed for each reshuffling. The threshold corresponding to a significance level of $p < 0.05$ was estimated as the number of coactive cells exceeded in a single frame in only 5% of these histograms. This threshold was used to calculate the duration of a synchronous activity pattern that is the number of successive frames for which the number of coactive cells was superior to threshold. Experimental values are given as means \pm SEMs. Student's t test and χ^2 test were used for statistical comparisons.

Chemical identification of contaminants

One milligram of DL-BHB was dissolved in a mixture of ethyl acetate and pentafluoropropionic anhydride (PFPA) (Aldrich) and composed of 80 μ l each. After 30 min at 80°C, 1 μ l of the mixture was directly injected into a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) instrument (Agilent Technologies) equipped with a 6890N GC and a 5973 MSD system. Electron impact mass spectrum of dibenzylamine (DBA) as PFPA derivative was identified in the DL-BHB acid standard from Acros Organics but not in DL-BHB from Sigma-Aldrich. A PFPA was identified as its molecular ion at a mass-to-charge ratio (m/z) of 383 and a typical fragmentation with the predicted M-91 at m/z of 252 and the benzyl core at m/z of 91. Chromatographic conditions were as follows: DB-1MS capillary column (Agilent Technologies), 30 m \times 0.25 mm inner diameter, film thickness of 1.0 μ m; column temperature, 100–260°C at a rate of 4°C/min; injection port, 280°C; gaz vector helium at 1 ml/min (10.4 psi); electron impact mode at an ionization energy of 70 eV. Comparisons of mass spectra were done by using a standard of DBA treated in the same conditions.

Pharmacology

Bicuculline, 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfonyl-benzo[f]quinoxaline, D-APV, DNQX, and CNQX were purchased from Tocris Bioscience; DL-BHB was from Sigma-Aldrich (catalog #54965, batch #1316259 31908044) and from Acros Organics. Isoguvacine, dybenzylamine, GABA, lactate, and pyruvate were from Sigma. TTX was from Ascent Scientific Ltd.

Results

Blood concentrations of D-BHB, lactate, and pyruvate in neonatal rodent

In newborn rodents, the blood levels of active D-BHB are in the submillimolar range (see Discussion). We reinvestigated this issue, using an assay that determines D-BHB levels, and found that, in P7 rats, the D-BHB plasma concentration was 0.91 ± 0.15 mM ($n = 14$). We measured D-BHB levels after administration of insulin (0.33 U/kg, i.m.) to inhibit fatty acid oxidation and 2-mercaptopropionate (100 mg/kg, i.p.) to inhibit mitochondrial acetyl-CoA dehydrogenase with 5 mM glucose to prevent hypoglycemia. This treatment strongly and rapidly (within 1 h) reduced the plasma level of the D-BHB to 0.14 ± 0.03 mM ($n = 14$). Conversely, injections of exogenous 4 mM DL-BHB increased the blood D-BHB concentration to 1.74 ± 0.42 mM ($n = 7$). Using conventional hospital kits, plasma lactate and pyruvate levels at P4 were of 1.5 ± 0.25 mM and 123 ± 16 μ M, respectively ($n = 5$). Therefore, plasma D-BHB, pyruvate, and lactate

concentrations are much lower than those used by Zilberman and colleagues (4 mM DL-BHB, 5 mM pyruvate, and 5 mM lactate). The difference is particularly high for pyruvate (40-fold) (see Discussion).

DL-BHB (from Sigma-Aldrich) does not alter the driving force for somatic GABA_AR-mediated currents

The binding of GABA to GABA_A receptors opens channels permeable notably to chloride. The resulting trans-membrane chloride current can either depolarize or hyperpolarize the membrane according to its E_{GABA} and E_m of the cell. As indicated in previous studies, measurement of E_m using NMDAR channels as the voltage sensor has an advantage over the other microelectrode techniques especially in immature cells with high input resistance (Tyzio et al., 2003). Single NMDAR and GABA_AR channels were recorded from either the same neurons or from different neurons to determine E_m and driving force for somatic GABA_AR-mediated currents (DF_{GABA}) and thereby allow a precise determination of E_{GABA} (Tyzio et al., 2008). As in the studies by Rheims et al. (2009) and Holmgren et al. (2010), slices were incubated in 4 mM DL-BHB (Sigma-Aldrich) for at least 40 min and then transferred to a recording chamber in which they were continuously superfused with the same concentration of DL-BHB.

We first determined E_{GABA} by alternate cell-attached recordings (in sum, four attempts for every cell) of NMDAR and GABA_AR single channels from the soma of the same neuron in the neocortex (Fig. 1). As shown in Table 1, DL-BHB altered neither E_m nor E_{GABA} in neocortical neurons (P4–P5 rats) of both superficial and deep layers (all $p > 0.05$). Similar results were obtained when single NMDAR and GABA_AR channels were recorded in different neurons (to avoid the potential local membrane alterations): DF_{GABA} in hippocampal CA3 pyramidal cells was not significantly different in control and 4 mM DL-BHB (Table 2) ($p > 0.05$); E_m in the same population of cells also did not change significantly in DL-BHB ($p > 0.05$). Similarly, in both superficial and deep layers of the neocortex, DF_{GABA} was strongly depolarizing in control conditions and in the presence of DL-

Table 1. Double measurement of DF_{GABA} and E_m from the same neocortical cell reveal that DL-BHB does not alter E_{GABA} in pyramidal neocortical cells

	Regular ACSF	ACSF + DL-BHB at 4 mM
n	6	6
E_m (mV)	-81.7 ± 2.6	-79.2 ± 2.9
DF_{GABA} (mV)	14.8 ± 3.3	13.7 ± 3.1
E_{GABA} (mV)	-66.9 ± 3.9	-65.5 ± 3.1

DF_{GABA} inferred from $I-V$ curves of single GABA_AR channels, E_m inferred from $I-V$ curves of single NMDAR, and the GABA_AR channels reversal potential.

BHB; the values of E_m were similar in control conditions and in the presence of DL-BHB (all $p > 0.05$) (Table 2). Therefore, DL-BHB alters neither E_m nor E_{GABA} in neocortical and hippocampal neurons.

DL-BHB does not alter the polarity of synaptic GABAergic responses

We then used perforated patch recordings to determine the effects of DL-BHB on synapse-driven GABA_AR-mediated postsynaptic potentials (GPSPs). In immature hippocampal slices, GABA released from MF terminals exerts a depolarizing action on CA3 principal cells in gramicidin perforated patch recordings (Sivakumaran et al., 2009). With gramicidin patch recordings from CA3 pyramidal cells, the resting membrane potential was -56 ± 2.2 mV ($n = 10$) (Fig. 2A–C). The more depolarized E_m value found with these experiments (with respect to that observed in cell-attached recordings) could be attributed to the leakage via gigaseal contact introduced in perforated patch recordings (Barry and Lynch, 1991; Tyzio et al., 2003). In the presence of 20 μ M DNQX and 50 μ M D-AP-5 to block AMPA and NMDA receptors, respectively, local stimulation of GABAergic interneurons in stratum radiatum generated PSPs with reversed polarity (E_{GPSPs}) at -47.6 ± 3.3 mV ($n = 10$). The driving force for GABA was ~ 9 mV positive to E_m , indicating that GABA is depolarizing from the resting potential as a result of the activity of chloride accumulating NKCC1 cotransporter (Tyzio et al., 2003, 2007; Sipila et al., 2006). Addition of DL-BHB (4 mM for at least 40 min) altered neither E_m (-60 ± 1 mV) nor E_{GPSPs} (-48 ± 2 mV; $n = 11$), with an average DF_{GABA} of ~ 12 mV. The values of E_m and E_{GPSPs} obtained in the presence of DL-BHB were not significantly different from those obtained in the absence of DL-BHB ($p > 0.05$ for both) (Fig. 2A–C). Therefore, DL-BHB does not alter E_{GPSPs} .

We also used gramicidin perforated patch recordings to determine whether DL-BHB alters the response evoked by GABA_A receptor agonists. The reversal of isoguvacine-evoked responses (E_{iso}) was determined in control and during bath application of 4 mM DL-BHB for at least 40 min. Isoguvacine (40 μ M, from a holding potential of -60 mV) generated inward currents that reversed at -48 ± 3 mV in control ($n = 6$) and -47 ± 3 mV in the presence of DL-BHB ($n = 6$). These values were not significantly different ($p > 0.05$) (Fig. 2D).

Furthermore, in three cells kept in current-clamp conditions in the presence of blockers of fast synaptic transmission (DNQX at 50 μ M, D-APV at 50 μ M, and bicuculline at 10 μ M), bath application of 4 mM DL-BHB altered neither the resting membrane potential nor the input resistance [values for E_m and R_{in} were -60 ± 3 and -61 ± 2 mV ($n = 6$) and 625 ± 37 and 575 ± 42 M Ω ($n = 6$, all $p > 0.05$), before and 40 min after DL-BHB application, respectively] (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

DL-BHB does not alter the excitatory effects of GABA

To determine whether DL-BHB alters the excitatory actions of GABA, we focally applied GABA on neurons recorded in cell-attached configuration in the presence of CNQX (10 μ M), APV (40 μ M), and CGP 55845 ((2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinic acid hydrochloride) (2 μ M) to block ionotropic glutamate and metabotropic GABA_B receptors. AQ: G

In these conditions, GABA triggered spikes and this action was reversibly blocked by the GABA_A receptor antagonists (data not shown), indicating that they were generated by the activation of GABA_A receptors. As shown in Figure 3A, focal applications of GABA, in the hippocampus in the presence of DL-BHB generated a similar number of spikes as in controls (1.29 ± 0.09 spikes in control and 1.44 ± 0.1 in DL-BHB, $n = 7$, $p > 0.05$). Similar results were obtained with neocortical layer V pyramidal neurons (1.39 ± 0.06 spikes in control and 1.23 ± 0.05 in the presence of DL-BHB, $n = 6$, $p > 0.05$). The specific NKCC1 antagonist bumetanide (10 μ M) prevented GABA from inducing spikes generated by focal applications of GABA in the presence of the same mixture and DL-BHB, confirming that they were generated by depolarizing actions of GABA (Fig. 3B) ($n = 3$). Therefore, DL-BHB applied in conditions similar to those used by Rheims et al. (2009) and Holmgren et al. (2010) does not alter the driving force and reversal potential of somatic (extrasynaptic) and synaptic GABA activated responses, the resting membrane potential, and excitatory actions of GABA on neocortical or hippocampal neurons.

DL-BHB does not alter GDPs

We next examined whether DL-BHB affects GDPs, which are dependent on depolarizing actions of GABA and are very sensitive to alterations of neuronal excitability and to insufficient energy supply (Ben-Ari et al., 1989; Dzhala et al., 1999; Allène et al., 2008). As shown in Figure 4, GDPs occurred synchronously with extracellular field potentials and were readily identified in whole-cell recordings by their characteristic shape and kinetics. DL-BHB altered neither the frequency [0.054 ± 0.005 and 0.046 ± 0.004 Hz in control ($n = 7$) and DL-BHB ($n = 8$), respectively; $p > 0.05$] nor the integrated area under GDPs [26.6 ± 3.1 mV/s ($n = 6$) and 24.3 ± 3.2 mV/s ($n = 7$) in control and DL-BHB, respectively; $p > 0.05$].

We next used fast multineuron calcium imaging to measure the actions of DL-BHB on neuronal activity synchronization in cortical networks. This approach enables investigating the spatio-temporal dynamics of spontaneous neuronal activity in large neocortical and hippocampal networks with single-cell resolution. With this approach, immature hippocampal and neocortical networks display similar correlated activity patterns composed of synchronous plateau assemblies (SPAs) and GDPs that are both strongly modulated by the excitatory action of GABA (Crépel et al., 2007; Allène et al., 2008; Bonifazi et al., 2009). These patterns can be easily identified in single cells based on their characteristic calcium dynamics because SPAs are associated with long-lasting (~ 10 –20 s on average) calcium plateau potentials synchronized across small groups of neurons, whereas the intracellular calcium correlate of GDPs are fast calcium transients (~ 250 ms) decay (Crépel et al., 2007; Allène et al., 2008) synchronizing larger neuronal populations. To determine whether DL-BHB affected neuronal calcium dynamics, multibeam two-photon imaging in neocortical slices loaded with a calcium indicator (fura-2 AM) was performed. Slices were incubated in 4 mM DL-BHB for at least 40 min. Custom software was

Table 2. DL-BHB does not alter DF_{GABA} and E_m in principal cells of rat hippocampus and neocortex: changes of DF_{GABA} determined with cell-attached recording of $GABA_A$ channels in hippocampal CA3 cells and both superficial and deep layers of neocortex

	Hippocampus		Neocortex	
	regular ACSF	ACSF + DL-BHB at 4 mM	regular ACSF	ACSF + DL-BHB at 4 mM
E_m (mV)	-77.8 ± 3.5 ($n = 9$)	-76.2 ± 4.2 ($n = 12$)	-72.2 ± 5.4 ($n = 5$)	-70.6 ± 3.2 ($n = 7$)
DF_{GABA} (mV)	19.8 ± 6.5 ($n = 12$)	16.5 ± 3.5 ($n = 14$)	22.9 ± 4.2 ($n = 10$)	18.2 ± 3.6 ($n = 11$)

Note that, in this set of experiments, DF_{GABA} and E_m were examined in different cells.

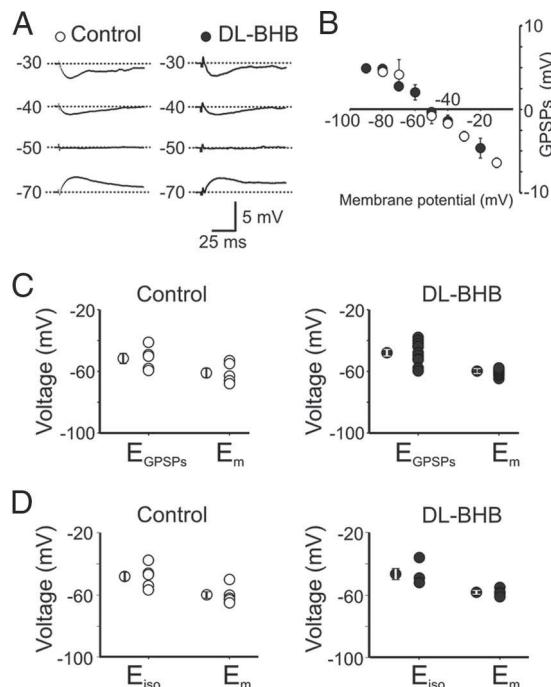


Figure 2. DL-BHB does not alter the polarity of GABAergic responses in CA3 pyramidal cells. **A**, Example of $GABA_A$ -mediated postsynaptic potentials evoked in control and in the presence of 4 mM DL-BHB at four different holding potentials (to the left of the traces) by local stimulation of GABAergic interneurons in stratum radiatum. **B**, The mean GPSP amplitudes obtained in 11 cells are plotted against membrane potentials (E_m). Vertical bars represent the SEM. **C**, Each symbol represents the E_{GPSPs} and the E_m of individual cells. Average values are shown on the left of each group (control: $E_{GPSPs} = -47.6 \pm 3.3$ mV, $E_m = -56 \pm 2.2$ mV, $n = 10$; in DL-BHB: $E_{GPSPs} = -48.2 \pm 2$ mV, $E_m = -60 \pm 1$ mV, $n = 11$). **D**, The E_{iso} was determined in control and during bath application of DL-BHB (4 mM, for at least 40 min). The isoguvacine application (40 μ M) generated the responses, which reversed at -48 ± 3 mV in control ($n = 6$) and -47 ± 3 mV in DL-BHB ($n = 6$), respectively. These values were not significantly different ($p > 0.05$).

used to measure fluorescence changes in each cell and to mark the onset and offset of individual calcium transients (see Materials and Methods). In these conditions, we did not find any significant decrease in either the fraction of neurons producing SPAs or the frequency and amplitude of GDPs in neocortical slices ($p > 0.05$, $n = 5$ slices) (Fig. 5, Table 3). As a positive control for excitatory GABA actions, we applied the NKCC1 antagonist bumetanide (10 μ M). Bumetanide significantly reduced the occurrence of GDPs both in regular ACSF and in the presence of DL-BHB (Fig. 5). Frequency and amplitude of GDPs were reduced to 26 ± 21 and $38 \pm 10\%$, respectively, in regular ACSF ($n = 7$, $p < 0.05$) and to 12 ± 7 and $56 \pm 34\%$, respectively, in DL-BHB conditions ($n = 5$, $p < 0.05$). As reported previously in hippocampal slices (Crépel et al., 2007), the fraction of SPA cells was significantly increased in the presence of bumetanide (10 μ M, to 535 ± 192 and $349 \pm 104\%$ in regular ACSF and DL-BHB, respectively, $n = 5$, $p < 0.05$). The effects of bumetanide cannot be reconciled with a reduction of the depolarizing action of GABA in the presence of DL-BHB (Rheims et al., 2009) (see Discussion).

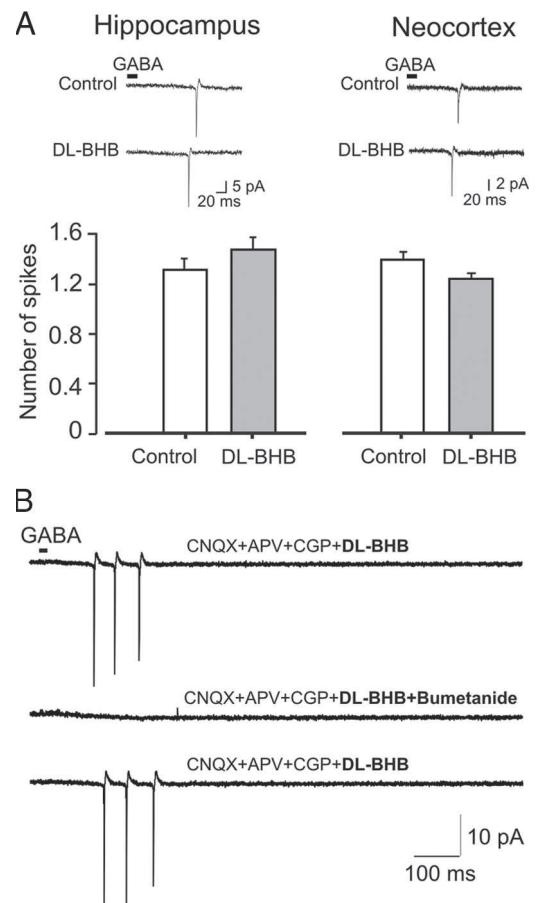


Figure 3. DL-BHB does not alter the excitation produced by focal application of GABA in both hippocampus and neocortical pyramidal neurons. **A**, Each column represents number of spikes induced by focal application of GABA (top traces) recorded in cell-attached mode from hippocampus and neocortex in control and in presence of 4 mM DL-BHB. **B**, Bumetanide (10 μ M) fully blocked the spikes generated by focal applications of GABA in the presence of the same mixture and DL-BHB ($n = 3$).

A contamination in DL-BHB (from Acros Organics) reduces DF_{GABA}

While conducting our experiments, we found that DL-BHB from another source (Acros Organics) gave different results. In slices incubated in 4 mM DL-BHB (Acros Organics for at least 40 min), DF_{GABA} measured using cell-attached recordings of $GABA_A$ channels was significantly reduced in CA3 pyramidal cells from 12.2 ± 3.9 mV ($n = 6$) to 0.47 ± 3.04 mV ($n = 10$, $p < 0.05$; data not shown). Similar effects of DL-BHB (Acros Organics) were found with perforated patch recordings of GPSPs evoked by local stimulation of GABAergic interneurons in stratum radiatum in the presence of DNQX (20 μ M) and D-APV (50 μ M). As shown in supplemental Figure 2 (available at www.jneurosci.org as supplemental material), DL-BHB from Acros Organics (applied for at least 45 min) hyperpolarized the membrane and shifted E_{GPSPs} toward more negative values (on average, on seven neurons E_m

and E_{GPSPs} were -80 ± 4 and -67 ± 4 mV, respectively). In additional experiments, we tested the actions of DL-BHB (Acros Organics) on GDPs using calcium imaging. As shown in supplemental Figure 3 (available at www.jneurosci.org as supplemental material), DL-BHB (Acros Organics) reduced the frequency and amplitude of GDPs in neocortical slices (from 0.12 ± 0.02 to 0.02 ± 0.01 Hz and from 22 ± 3 to $5 \pm 4\%$ of active cells, $n = 5$, $p < 0.05$). Therefore, DL-BHB (Acros Organics) reduces DF_{GABA} and alters GDPs.

Because previous studies reported the presence of a contaminant in L-BHB (Donevan et al., 2003) (see Discussion), we decided to test whether a similar contaminant was also present in DL-BHB obtained from this source (Acros Organics). Using a GC-MS instrument, several contaminants were found in this source of DL-BHB, notably DBA as PFPA derivative identified in the DL-BHB from Acros Organics (supplemental Fig. 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material) but not in DL-BHB (Sigma-Aldrich; data not shown). We therefore tested the actions of DBA on DF_{GABA} and found that $50 \mu M$ DBA switched DF_{GABA} , determined with single-channel recordings, from depolarizing 12.8 ± 2.8 mV ($n = 10$) to hyperpolarizing -2.9 ± 2.2 mV ($n = 10$, $p < 0.001$; data not shown). With whole-cell recordings, DBA also blocked GDPs in a concentration-dependent way with an EC_{50} of $57 \mu M$ (supplemental Fig. 5, available at www.jneurosci.org as supplemental material). The dose-response curve was steep: whereas at $60 \mu M$ DBA severely reduced the frequency of GDPs from 0.046 ± 0.007 to 0.01 ± 0.002 Hz, at $80 \mu M$ it completely abolished them ($n = 10$). These observations suggest that DL-BHB does not alter GABA signals, but care must be taken when using BHB compounds to ensure absence of contaminants. We next investigated the actions of pyruvate on the same parameters.

High but not physiological concentrations of pyruvate affect GABA signaling

We first tested the effect of pyruvate at 5 mM on DF_{GABA} in single-channel recordings of CA3 pyramidal cells from P7 rat hippocampus. DF_{GABA} shifted from 12.2 ± 5.7 mV in control ($n = 9$) to 0.4 ± 3 mV in pyruvate ($n = 9$, $p < 0.01$; data not shown). In contrast, more relevant physiological concentrations ($200 \mu M$) did not significantly change DF_{GABA} (7.1 ± 3.2 mV in control, $n = 7$ and 6.7 ± 2.5 mV in pyruvate, $n = 8$, $p > 0.05$; data not shown). Therefore, pyruvate does not affect DF_{GABA} at physiological levels and alters DF_{GABA} only at excessively high concentrations.

Gramicidin perforated patch experiments were performed to assess whether pyruvate alters E_m and E_{GPSPs} . Like DL-BHB, the addition of a physiological concentration of $200 \mu M$ pyruvate to the ACSF did not modify E_m and E_{GPSPs} (Fig. 6). E_m values were -56.8 ± 0.9 and -57.1 ± 1.02 mV in control and in the presence of pyruvate, respectively ($p > 0.05$, $n = 7$). In contrast, 5 mM pyruvate caused a negative shift of E_{GPSPs} (from -48.3 ± 1.9 to -55.7 ± 3 mV, $n = 7$) without altering E_m (E_m values were -56.8 ± 0.9 and -56.6 ± 1.8 mV in control and in the presence

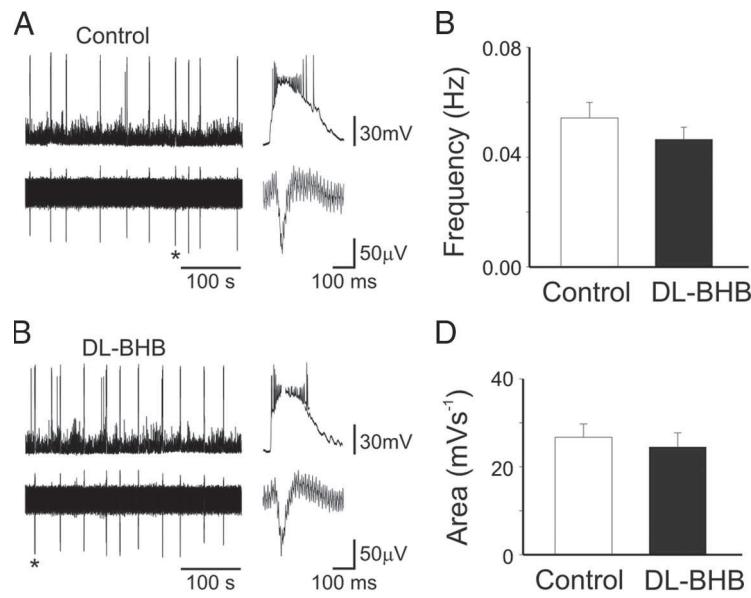


Figure 4. DL-BHB does not alter spontaneous neuronal activity patterns at early postnatal stages in hippocampal slices. **A, B**, Individual traces of spontaneous GDPs recorded at -70 mV from CA3 pyramidal cell (top traces) and field potentials (bottom traces) in slice exposed to ACSF (control, **A**) or ACSF plus DL-BHB at 4 mM . **B**, DL-BHB did not alter the frequency or the shape of GDPs (shown on the right in an expanded timescale). **C, D**, Each column represent the mean GDPs frequency (**C**) or area (**D**) in control (white; $n = 6$) or during bath application of DL-BHB (black; $n = 7$). * $p < 0.01$.

of 5 mM pyruvate, respectively, $n = 7$). The driving force for GABA was ~ 0.9 mV positive to E_m , indicating that GABA does not exert a depolarizing action. The E_{GPSPs} value observed in the presence of 5 mM pyruvate was significantly different from that obtained in control ($p = 0.003$) or in the presence of $200 \mu M$ pyruvate ($p = 0.005$). E_m and E_{GPSPs} were unaffected by the further addition of DL-BHB to 5 mM pyruvate. In the presence of 4 mM DL-BHB and 5 mM pyruvate, E_m and E_{GPSPs} were -57.4 ± 2.5 and -59.6 ± 2.9 mV, respectively ($n = 6$). These values are similar to those obtained when cells were exposed only to pyruvate (data not shown).

Furthermore, with extracellular field potential recordings from the CA3 region (P4–P7), pyruvate at a physiological concentration did not affect the frequency of GDPs (0.06 ± 0.008 and 0.06 ± 0.01 Hz in control and in the presence of $200 \mu M$ pyruvate, respectively; $p > 0.05$, $n = 6$) (Fig. 7). In contrast, in the presence of 5 mM pyruvate, the frequency of GDPs severely depressed (from 0.06 ± 0.008 to 0.02 ± 0.007 Hz, $p = 0.005$, $n = 6$).

Similar observations were made with imaging techniques. We monitored spontaneous neuronal activity in neocortical and hippocampal slices bathed in mACSF that mimics physiological conditions (lactate at 1.5 mM , pyruvate at $150 \mu M$, and DL-BHB at 2 mM ; see Discussion). There was no change in GDPs or SPA patterns of activity (Fig. 8, Table 4) ($p > 0.05$, five neocortical slices and three hippocampal slices). Indeed, the frequency of neocortical GDPs in mACSF was 0.1 ± 0.02 Hz compared with 0.12 ± 0.02 Hz in control conditions, and the amplitude of neocortical GDPs was 24 ± 4 compared with $22 \pm 3\%$ of active cells in regular ACSF. The frequency of hippocampal GDPs in mACSF was not affected either (0.07 ± 0.03 vs 0.1 ± 0.03 Hz in control conditions). In contrast, pyruvate (5 mM), added to regular ACSF, significantly reduced the frequency and amplitude of hippocampal GDPs to 8 ± 7 and $53 \pm 33\%$ of control conditions, respectively (supplemental Fig. 6) ($n = 5$, $p < 0.05$). Therefore, pyruvate alters GABA postsynaptic currents and GDPs only at high nonphysiological concentrations.

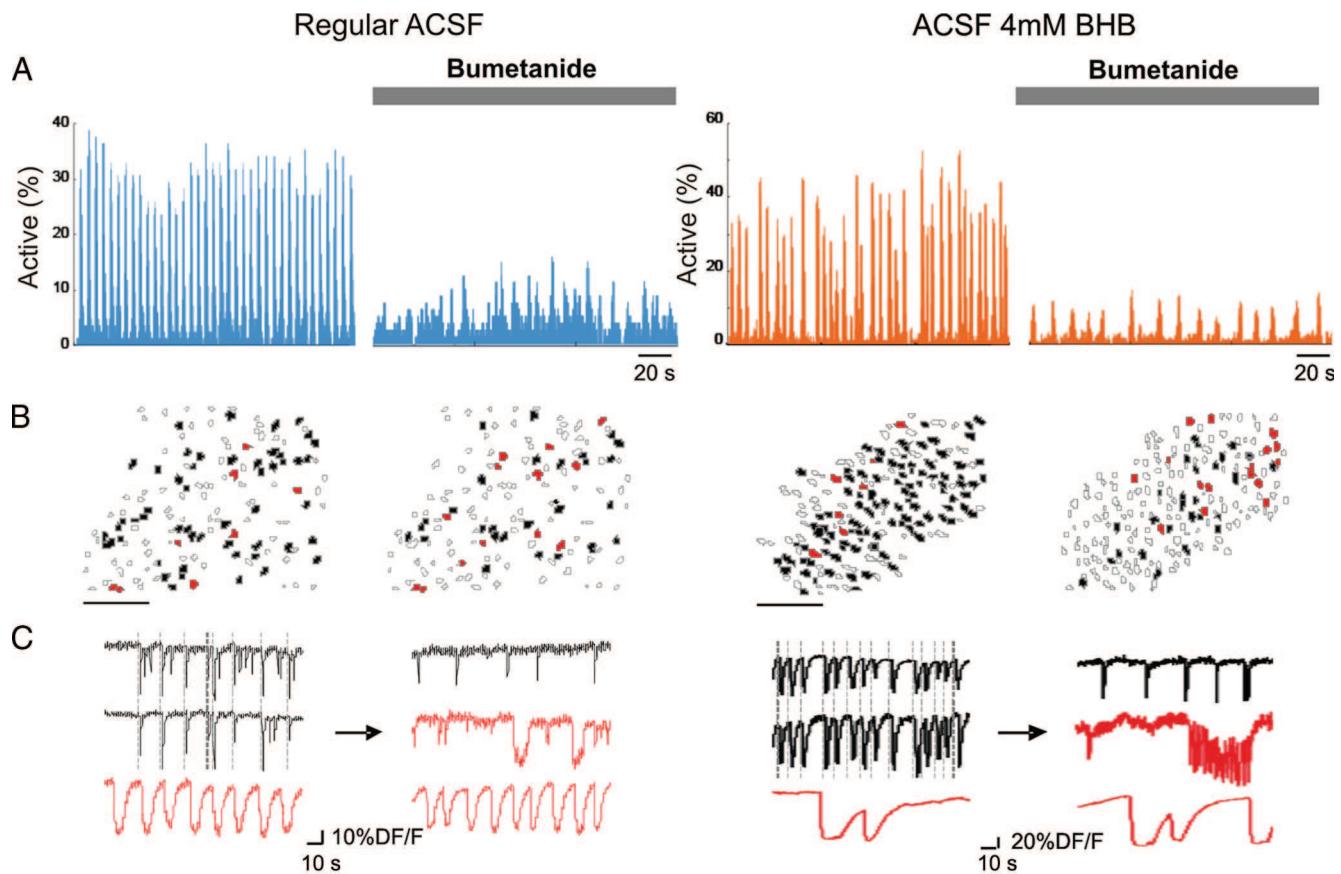


Figure 5. *dl*-BHB does not alter spontaneous neuronal activity patterns in neocortical slices. *A*, Histograms indicating the fraction of active cells as a function of time in calcium movies in regular ACSF and in the presence of 4 mM *dl*-BHB (Sigma-Aldrich). Each peak of synchronous neuronal activity in the histograms corresponds to a GDP. GDPs were strongly reduced in the presence of the NKCC1 antagonist bumetanide (10 μ M) in neocortical slices from P7 rats. *B*, Automatically detected contours of the imaged cells: open contours indicate silent cells, black filled contours indicate cells involved in GDPs, and red filled contours are SPA cells. Note that the number of SPA cells relative to the number of active cells increased in the presence of 10 μ M bumetanide in the neocortex and hippocampus (scale bar, 100 μ m). *C*, Calcium fluorescence traces of representative cells implicated in GDPs (black) and SPAs (red). Note that some GDP cells display an SPA pattern of activity after adding bumetanide (middle traces).

Table 3. Dynamics of cortical GDPs and SPAs in regular ACSF and in the presence of *dl*-BHB (Sigma-Aldrich)

	Regular ACSF	ACSF + <i>dl</i> -BHB at 4 mM
<i>n</i>	7	5
GDP _{freq} (Hz)	0.12 \pm 0.02	0.14 \pm 0.05
GDP _{amp} (%)	22 \pm 3	22 \pm 4
SPA cells (%)	8 \pm 2	17 \pm 11

GDP_{freq}, Frequency of occurrence of GDPs (in hertz); GDP_{amp}, fraction of active cells involved in GDPs (percentage); SPA cells, fraction of active cells involved in SPAs (percentage).

Discussion

We show that neither *dl*-BHB, used in similar concentrations as Zilberman and colleagues, nor pyruvate at physiologically relevant concentrations alters GABA depolarizing actions and GDPs, suggesting that depolarizing GABA and GDPs in immature neurons are not attributable “to energy deprived conditions when relying only on glucose” (Rheims et al., 2009; Holmgren et al., 2010).

Possible reasons for the discrepancies

dl-BHB at 4 mM (Sigma-Aldrich) had no effects on (1) E_m , E_{GABA} , and DF_{GABA} in somatic recordings of single GABA and NMDA channels, (2) E_m , synaptic GABAergic potentials and the responses evoked by GABA application in gramicidin perforated patch recordings, (3) spikes generated by GABA

in cell-attached recordings, and (4) frequency of GDPs or SPAs relying on calcium imaging and electrophysiological recordings.

The wide range of E_{GABA} values reported by Holmgren et al. (2010) suggests a heterogeneity possibly attributable to pooling different ages particularly between P1 and P4 in which major shifts occur in E_{GABA} (Tyzio et al., 2006, 2007) in superficial and deep neocortical layers neurons or CA1 and CA3 pyramidal neurons with their different age (Ben-Ari et al., 2007; Rheims et al., 2008). Additional explanations to the discrepancy between the present study and the work of Zilberman and colleagues include the experimental approaches to measure E_{GABA} . (1) Cell-attached recordings of GABA channels without potassium channel blockers in the pipette could be contaminated by potassium channels and shift the measures to potassium reversal. (2) Prolonged activation of GABA receptors by long (2 s) isoguvacine applications and voltage ramps at the peak of the response used to determine E_{GABA} can be associated with profound changes in ionic distribution. Here, we used brief (50–200 ms) isoguvacine applications and synaptic stimulations at different holding potentials to minimize the error. (3) The “random” burst protocol used to record the spikes evoked by synaptic activation of GABA receptors may introduce activity-dependent disturbance in ionic gradients (the same applies for repetitive puff application of isoguvacine). This was controlled in the present study by wash in

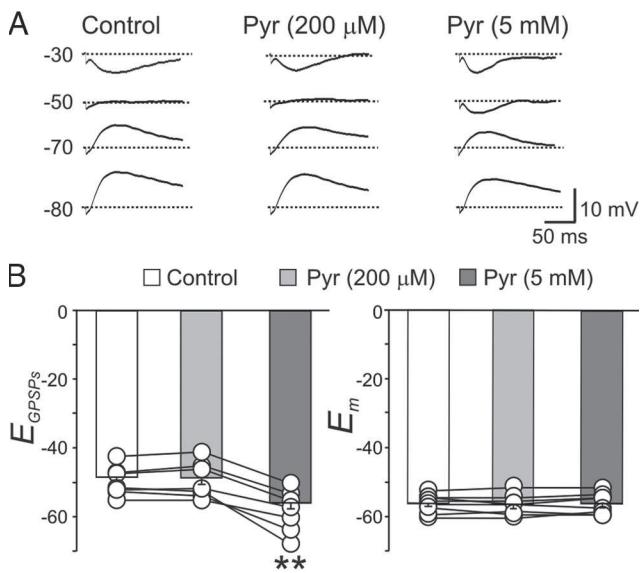


Figure 6. E_{GSPS} shift in the presence of high but not low concentrations of pyruvate. **A**, Examples of GABA_A-mediated postsynaptic potentials evoked in control (white, left), in the presence of 200 μ M pyruvate (Pyr) (light gray, middle), and in the presence of 5 mM pyruvate (dark gray, right). **B**, Open circles represent E_{GSPS} (graph on the left) and E_m (graph on the right) obtained in individual cells recorded in normal ACSF (white columns; left), in ACSF containing 200 μ M (light gray; middle) or 5 mM (dark gray; right) pyruvate ($n = 7$). Bars at the top of the columns represent the SEM. Note the negative shift of E_{GSPS} but not in E_m of cells exposed to 5 mM pyruvate. The mean E_{GSPS} value obtained in 5 mM pyruvate was significantly different from that obtained in control ($p = 0.003$) and in 200 μ M pyruvate ($p = 0.005$). ** $p < 0.01$.

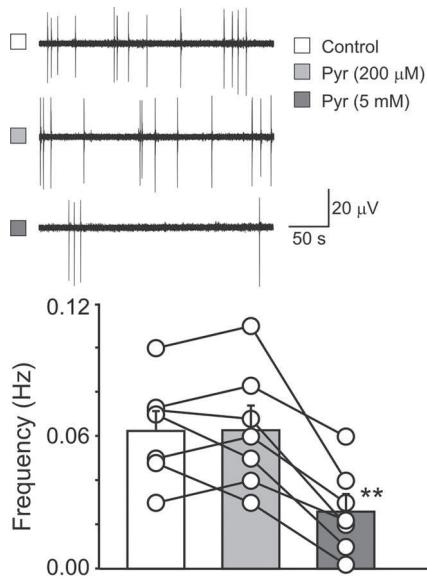


Figure 7. High but not low concentrations of pyruvate reduce GDPs frequency. On the left, sample traces of spontaneous GDPs recorded from the same slice before (white symbol; top trace) or during exposure to 200 μ M pyruvate (Pyr) (light gray; middle trace) and 5 mM pyruvate (dark gray; bottom trace). Note the reduction in GDPs frequency with 5 mM but not 200 μ M pyruvate. On the right, each symbol represents the mean frequency value of GDPs obtained in individual slices before (white column) or during exposure to 200 μ M (light gray) and 5 mM (dark gray; right) pyruvate ($n = 7$). Bars at the top of the columns represent the SEM. The mean GDPs frequency value obtained in 5 mM pyruvate was significantly different from that obtained in control ($p = 0.005$) and in 200 μ M pyruvate ($p = 0.005$). * $p < 0.05$.

and washout of bicuculline or bumetanide. Finally, the non-invasive quantitative determination of the percentage of neurons active during SPAs and GDPs suggests that both DL-BHB and pyruvate have no effects on these patterns.

The presence of a contaminant dibenzylamine in DL-BHB (Acros Organics) that changes DF_{GABA} and E_{GABA} is important for future studies. DBA mediates effects thought previously to be attributable to DL-BHB blockade of cardiac K⁺ channels and anticonvulsive actions of ketone bodies (Doepner et al., 1997, 2001; Rho et al., 2002; Donevan et al., 2003). Investigations using DL-BHB must take this parameter into account.

Physiologically relevant concentrations of D-BHB, lactate, and pyruvate

Neonatal plasma concentrations of D-BHB (present results; see also Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993; Lust et al., 2003; Vannucci and Simpson, 2003; Erecinska et al., 2004; Nehlig, 2004) are significantly lower than those used by Rheims et al. (2009) and Holmgren et al. (2010), particularly because only a fraction (40%) of plasma D-BHB is found in neonatal cortex (Lust et al., 2003). In addition, the argument that 4 mM DL-BHB is equivalent to 2 mM active D-BHB (Rheims et al., 2009) is invalidated by the observations that L-BHB exerts complex biological actions (Moore et al., 1976; Webber and Edmond, 1977; Herzberg and Gad, 1984; Eaton et al., 2003; Tsai et al., 2006; Chou et al., 2008). Also, ketogenic diet reduces glucose utilization by 10% per millimolar plasma ketone bodies (Robinson and Williamson, 1980; Harding and Charlton, 1990; LaManna et al., 2009), hampering the interpretation and relevance of observations made using ACSF with glucose and DL-BHB.

The lactate (5 mM) and pyruvate (5 mM) concentrations used by Holmgren et al. (2010) are never observed in postnatal physiological conditions. Plasma lactate levels are high *in utero* (10 mM), shift to 3 mM during the presuckling period, and remain thereafter close to 1 mM (Medina, 1985), and even then glucose supplies most of the energy (Burd et al., 1975; Jones et al., 1975; Pégrier et al., 1977). The plasma lactate/pyruvate ratio is close to 10 (with 100 μ M pyruvate), and higher lactate and (or) lactate/pyruvate ratios are only observed in dystonia, subarachnoid hemorrhage, brain traumas, epilepsies, pyruvate dehydrogenase mutations, and other severe pathological conditions (Owen et al., 1967; Medina, 1985; Fernandez et al., 1986; Mintun et al., 2004; Bjerring et al., 2008; Brody et al., 2008; Rex et al., 2009). In keeping with this, we found pyruvate levels \sim 120 μ M that are identical to human levels and 40-fold lower than the concentrations used by Zilberman and colleagues. At physiological levels, pyruvate and lactate had no effects on excitatory actions of GABA, DF_{GABA} , and GDPs.

The reduction of DF_{GABA} and GDPs by exceedingly high concentrations of pyruvate (5 mM) is most likely attributable to the acidosis produced at these concentrations. Agents that alter tissue pH alter intracellular chloride (Kaila and Voipio, 1987; Kaila et al., 1993; Chesler, 2003; Glykys et al., 2009; Kim and Trussell, 2009), neuronal excitability, and seizures (Roos and Boron, 1981; Aram and Lodge, 1987; Balestrino and Somjen, 1988; Jarolimek et al., 1989; Kaila, 1994; Bonnet et al., 2000; Dulla et al., 2005, 2009; Ziemann et al., 2008). Propionate, D- and L-lactate reduce GDPs, although only L-lactate is metabolically active (Roos and Boron, 1981; Dulla et al., 2005; Ruusuvori et al., 2010). Therefore, depolarizing actions of GABA are not attributable to the absence of DL-BHB or lactate/pyruvate in the ACSF.

Ketone bodies and GABA signaling

Ketosis (Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993), like transporters that import D-BHB (Pellerin et al., 1998; Magistretti et al., 1999; Bergersen et al., 2002; Pierre et al., 2002; Rafiki et al., 2003; Vannucci and Simpson, 2003; Erecinska et al., 2004) or BHB

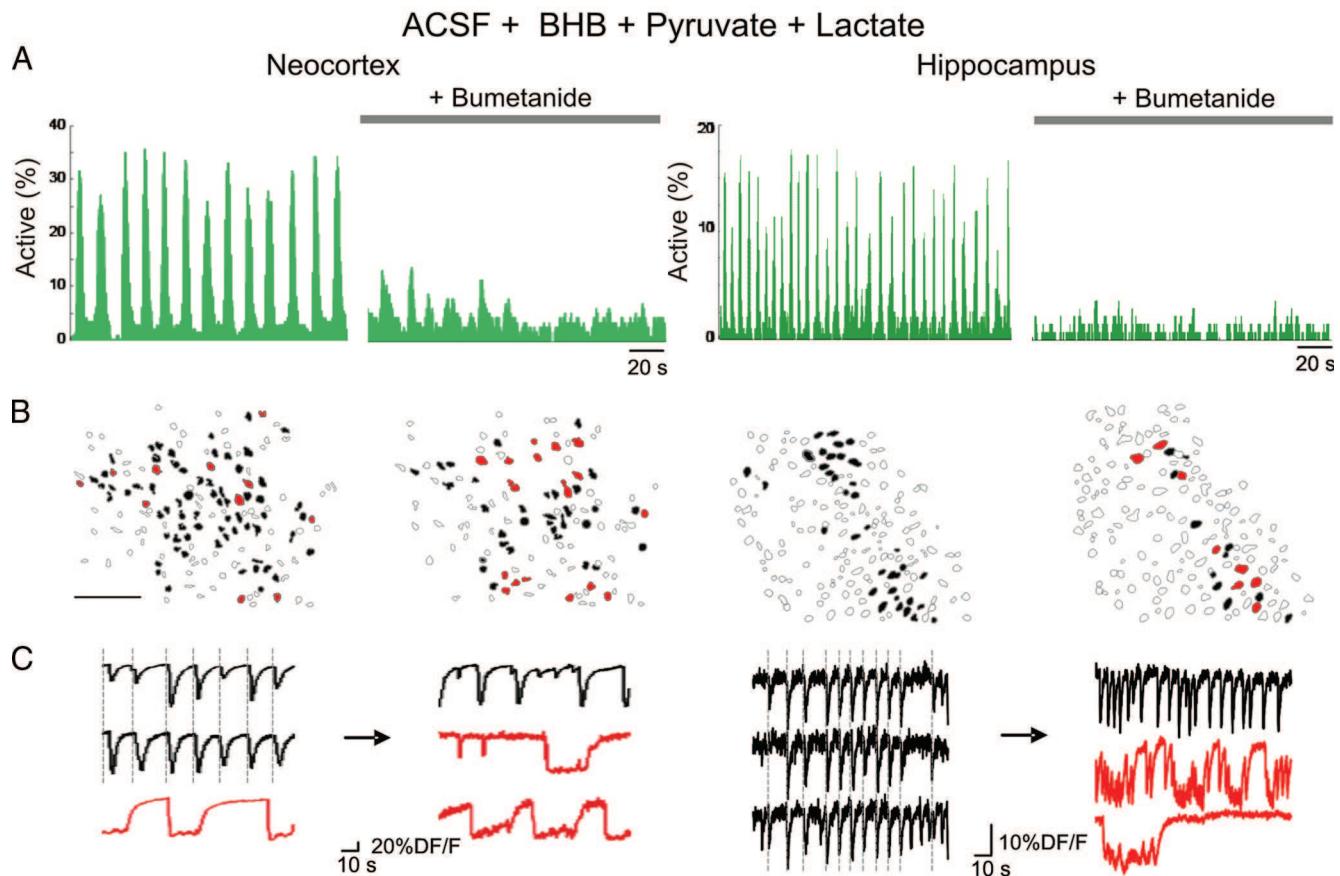


Figure 8. GDPs recorded in the presence of physiological concentrations of lactate, pyruvate, and DL-BHB are similar to those recorded in regular ACSF and are reduced by bumetanide. **A**, Histograms indicating the fraction of active cells as a function of time in calcium movies in slices incubated with 1.5 mM lactate, 150 μM pyruvate, 5 mM glucose, and 4 mM DL-BHB (Sigma-Aldrich) for at least 1 h. Each peak of synchronous neuronal activity in the histograms corresponds to a GDP. GDPs were strongly reduced in the presence of the NKCC1 antagonist bumetanide (10 μM) in neocortical and hippocampal slices from P7 rats. **B**, Automatically detected contours of the imaged cells: open contours indicate silent cells, black filled contours indicate cells involved in GDPs, and red filled contours are SPA cells. Note that the number of SPA cells relative to the number of active cells increased in the presence of 10 μM bumetanide in both the neocortex and hippocampus (scale bar, 100 μm). **C**, Calcium fluorescence traces of representative cells implicated in GDPs (black) and SPAs (red). Note that some GDP cells display an SPA pattern of activity after adding bumetanide (middle traces).

Table 4. Dynamics of cortical GDPs and SPAs in the neocortex and the hippocampus in the presence of physiological concentrations of lactate, pyruvate, and DL-BHB

ACSF and DL-BHB + Pyruvate + Lactate	Neocortex	Hippocampus
n	5	3
GDP _{freq} (Hz)	0.1 ± 0.02	0.07 ± 0.03
GDP _{amp} (%)	60 ± 10	13 ± 1
SPA cells (%)	16 ± 4	3 ± 0.003

GDP_{freq}, Frequency of occurrence of GDPs (in hertz); GDP_{amp}, fraction of active cells involved in GDPs (percentage); SPA cells, fraction of active cells involved in SPAs (percentage).

dehydrogenase that metabolize it (Page et al., 1971; De Vivo et al., 1975; Leong and Clark, 1984; Bilger and Nehlig, 1991; Clark et al., 1993), peak during development well after the GABA shift. Fatty acid oxidation supports gluconeogenesis (Pégorier et al., 1977), and ketosis acts to “spare glucose for the emergence of audition, vision and more integrated behavior whose appearance during brain maturation seems to critically relate upon active glucose supply” (Nehlig, 2004). GABA currents are not affected by DL-BHB and ketogenic diet reduces seizures generated by GABA receptor antagonists (Appleton and De Vivo, 1973, 1974; Bough and Eagles, 1999; Bough et al., 2000; Thio et al., 2000; Sullivan et al., 2003; Hartman et al., 2007; Yellen, 2008; Maalouf et al., 2009), suggesting, contrary to Zilberman and colleagues, that the antiepileptic actions of ketone bodies are not mediated by GABA signal-

ing. GABA depolarizes immature neurons in nonmammalian animal species and *in utero* in rodents, suggesting that maternal milk and ketone bodies are not required for that effect (Akerman and Cline, 2006; Ben-Ari et al., 2007).

The NKCC1/KCC2 sequence in brain maturation

Contrary to the suggestions of Zilberman and colleagues (Rheims et al., 2009; Holmgren et al., 2010), extensive pharmacological, anatomical, and genetic observations suggest that the removal of chloride in neonatal pups heavily depends on KCC2 (Li et al., 2002; Rheims et al., 2008; Riekki et al., 2008; Zhu et al., 2008; Takayama and Inoue, 2010). The parallel alterations of KCC2 and GABA polarity have been confirmed in a large variety of animal species from invertebrates to humans (Rivera et al., 1999, 2005; Delpire, 2000; Payne et al., 2003; Sernagor et al., 2003; Dzhala et al., 2005; Akerman and Cline, 2006; Liu et al., 2006; Ben-Ari et al., 2007; Howard et al., 2007; Kahle et al., 2008; Reynolds et al., 2008; Blaesse et al., 2009; Glykys et al., 2009; Stil et al., 2009; Tanis et al., 2009; Boulenguez et al., 2010). KCC2 and E_{GABA} developmental sequences are unlikely to depend on global metabolic diets because they are cell and sex specific (Kandler and Friauf, 1995; Kandler et al., 2002; Balakrishnan et al., 2003; Gulacs et al., 2003; Lee et al., 2005; Lohrke et al., 2005; Banke and McBain, 2006; Blaesse et al., 2006; Kim and Trussell, 2009; Belenky et al., 2010). Neurons in which GABA remains depolar-

izing do not express KCC2 (Price et al., 2005; Gilbert et al., 2007; Pozas et al., 2008), and early overexpression of KCC2 in zebra fish embryos (Reynolds et al., 2008) or cortical neurons (Chudotvorova et al., 2005; Lee et al., 2005; Ben-Ari et al., 2007; Cancedda et al., 2007; Wang and Kriegstein, 2008) alter GABA polarity, GABA synapse formation, and neuronal development *in vivo*. KCC2 is downregulated by activity and E_{GABA} shifts accordingly (Woodin et al., 2003; Fiumelli et al., 2005).

Neonatal slices are not energy deprived in 10 mM glucose because they have a low rate of oxygen and glucose consumption and are less susceptible to energy deprivation than adult slices (Cherubini et al., 1989; Novotny et al., 2001; Tyzio et al., 2006). Lowering glucose reduces GDPs, ATP levels, and mitochondrial pH, confirming the sensitivity of GDPs to energy deprivation, but these are not restored by lactate (Takata and Okada, 1995; Wada et al., 1998; Takata et al., 2001) (Ruussuvori et al., unpublished report). Slices and intact hippocampi sustain GDPs for hours (Ben-Ari et al., 1989; Cherubini et al., 1989; Khalilov et al., 1997, 2003; Leinekugel et al., 1997; Safiulina et al., 2006) and are replaced by glutamate-driven early network oscillations when energy is deprived (Allène et al., 2008).

We conclude that the depolarizing action of GABA and related network-driven GDPs in immature cortical slices are not attributable to metabolic insufficiency. Therefore, conventional glucose containing ACSF provides adequate energy supply for cortical slices *in vitro*.

References

- Akerman CJ, Cline HT (2006) Depolarizing GABAergic conductances regulate the balance of excitation to inhibition in the developing retinotectal circuit *in vivo*. *J Neurosci* 26:5117–5130.
- Allène C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Cossart R (2008) Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J Neurosci* 28:12851–12863.
- Appleton DB, De Vivo DC (1973) An experimental animal model for the effect of ketogenic diet on epilepsy. *Proc Aust Assoc Neurol* 10:75–80.
- Appleton DB, DeVivo DC (1974) An animal model for the ketogenic diet. *Epilepsia* 15:211–227.
- Aram JA, Lodge D (1987) Epileptiform activity induced by alkalosis in rat neocortical slices: block by antagonists of *N*-methyl-D-aspartate. *Neurosci Lett* 83:345–350.
- Balakrishnan V, Becker M, Lörke S, Nothwang HG, Güresir E, Friauf E (2003) Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J Neurosci* 23:4134–4145.
- Balestrino M, Somjen GG (1988) Concentration of carbon dioxide, interstitial pH and synaptic transmission in hippocampal formation of the rat. *J Physiol* 396:247–266.
- Banker TG, McBain CJ (2006) GABAergic input onto CA3 hippocampal interneurons remains shunting throughout development. *J Neurosci* 26:11720–11725.
- Barry PH, Lynch JW (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol* 121:101–117.
- Belenky MA, Sollars PJ, Mount DB, Alper SL, Yarom Y, Pickard GE (2010) Cell-type specific distribution of chloride transporters in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 165:1519–1537.
- Ben-Ari Y (2001) Developing networks play similar melody. *Trends Neurosci* 24:354–360.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728–739.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradietti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303–325.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87:1215–1284.
- Bergersen L, Rafiki A, Ottersen OP (2002) Immunogold cytochemistry identifies specialized membrane domains for monocarboxylate transport in the central nervous system. *Neurochem Res* 27:89–96.
- Bilger A, Nehlig A (1991) Quantitative histochemical changes in enzymes involved in energy metabolism in the rat brain during postnatal development. I. Cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase. *Int J Dev Neurosci* 9:545–553.
- Bjerring PN, Hauerberg J, Frederiksen HJ, Jorgensen L, Hansen BA, Tofteng F, Larsen FS (2008) Cerebral glutamine concentration and lactate/pyruvate ratio in patients with acute liver failure. *Neurocrit Care* 9:3–7.
- Blaeser P, Guillemin I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khrisouf L, Friauf E, Nothwang HG (2006) Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *J Neurosci* 26:10407–10419.
- Blaeser P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61:820–838.
- Bonifazi P, Goldin M, Picardo MA, Jorquera I, Cattani A, Bianconi G, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R (2009) GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* 326:1419–1424.
- Bonnet U, Leniger T, Wiemann M (2000) Alteration of intracellular pH and activity of CA3-pyramidal cells in guinea pig hippocampal slices by inhibition of transmembrane acid extrusion. *Brain Res* 872:116–124.
- Bough KJ, Eagles DA (1999) A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in the rat. *Epilepsia* 40:138–143.
- Bough KJ, Yao SG, Eagles DA (2000) Higher ketogenic diet ratios confer protection from seizures without neurotoxicity. *Epilepsy Res* 38:15–25.
- Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L (2010) Downregulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 16:302–307.
- Brody DL, Magnoni S, Schwetye KE, Spinner ML, Esparza TJ, Stocchetti N, Zipfel GJ, Holtzman DM (2008) Amyloid-beta dynamics correlate with neurological status in the injured human brain. *Science* 321:1221–1224.
- Burd LI, Jones MD Jr, Simmons MA, Makowski EL, Meschia G, Battaglia FC (1975) Placental production and foetal utilisation of lactate and pyruvate. *Nature* 254:710–711.
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K, Poo MM (2007) Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons *in vivo*. *J Neurosci* 27:5224–5235.
- Cherubini E, Ben-Ari Y, Krnjević K (1989) Anoxia produces smaller changes in synaptic transmission, membrane potential, and input resistance in immature rat hippocampus. *J Neurophysiol* 62:882–895.
- Chesler M (2003) Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev* 83:1183–1221.
- Chou YC, Tsai YC, Chen CM, Chen SM, Lee JA (2008) Determination of lipoprotein lipase activity in post heparin plasma of streptozotocin-induced diabetic rats by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 22:502–510.
- Chudotvorova I, Ivanov A, Rama S, Hübner CA, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Medina I (2005) Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses. *J Physiol* 566:671–679.
- Clark JB, Bates TE, Cullingford T, Land JM (1993) Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. *Dev Neurosci* 15:174–180.
- Crépel V, Aronov D, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R (2007) A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* 54:105–120.
- Delpire E (2000) Cation-chloride cotransporters in neuronal communication. *News Physiol Sci* 15:309–312.
- De Vivo DC, Leckie MP, Agrawal HC (1975) D-beta-Hydroxybutyrate: a major precursor of amino acids in developing rat brain. *J Neurochem* 25:161–170.
- Doepner B, Thierfelder S, Hirche H, Benndorf K (1997) 3-hydroxybutyrate blocks the transient K^+ outward current in myocardial mouse cells in a stereoselective fashion. *J Physiol* 500:85–94 [retraction in *J Physiol* (1998) 508:956].
- Doepner B, Koopmann R, Knopp A, Hirche H, Benndorf K (2001) Dibenzylamine: a novel blocker of the voltage-dependent K^+ current in myocardial mouse cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364:9–13.
- Donevan SD, White HS, Anderson GD, Rho JM (2003) Voltage-dependent block of *N*-methyl-D-aspartate receptors by the novel anticonvulsant dibenzylamine, a bioactive constituent of L-(+)-beta-hydroxybutyrate. *Epilepsia* 44:1274–1279.
- Dulla CG, Dobelis P, Pearson T, Frenguelli BG, Staley KJ, Masino SA (2005)

- Adenosine and ATP link PCO₂ to cortical excitability via pH. *Neuron* 48:1011–1023.
- Dulla CG, Frenguelli BG, Staley KJ, Masino SA (2009) Intracellular acidification causes adenosine release during states of hyperexcitability in the hippocampus. *J Neurophysiol* 102:1984–1993.
- Dzhala V, Desfreres L, Melyan Z, Ben-Ari Y, Khazipov R (1999) Epileptogenic action of caffeine during anoxia in the neonatal rat hippocampus. *Ann Neurol* 46:95–102.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11:1205–1213.
- Eaton S, Chatziandreou I, Krywawych S, Pen S, Clayton PT, Hussain K (2003) Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with hyperinsulinism: a novel glucose-fatty acid cycle? *Biochem Soc Trans* 31:1137–1139.
- Erecinska M, Cherian S, Silver IA (2004) Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol* 73:397–445.
- Fernandez F, Verdu A, Quero J, Ferreiros MC, Daimiel E, Roche MC, Lopez-Martin V (1986) Cerebrospinal fluid lactate levels in term infants with perinatal hypoxia. *Pediatr Neurol* 2:39–42.
- Ferré P, Satabin P, Decaux JF, Escrivá F, Girard J (1983) Development and regulation of ketogenesis in hepatocytes isolated from newborn rats. *Biochem J* 214:937–942.
- Fiumelli H, Cancedda L, Poo MM (2005) Modulation of GABAergic transmission by activity via postsynaptic Ca²⁺-dependent regulation of KCC2 function. *Neuron* 48:773–786.
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105:521–532.
- Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A (1998) Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 507:219–236.
- Gilbert D, Franjic-Würtz C, Funk K, Gensch T, Frings S, Möhrlein F (2007) Differential maturation of chloride homeostasis in primary afferent neurons of the somatosensory system. *Int J Dev Neurosci* 25:479–489.
- Glykys J, Dzhala VI, Kuchibhotla KV, Feng G, Kuner T, Augustine G, Bacskai BJ, Staley KJ (2009) Differences in cortical versus subcortical GABAergic signaling: a candidate mechanism of electroclinical uncoupling of neonatal seizures. *Neuron* 63:657–672.
- Gulácsi A, Lee CR, Sik A, Viitanen T, Kaila K, Tepper JM, Freund TF (2003) Cell type-specific differences in chloride-regulatory mechanisms and GABA_A receptor-mediated inhibition in rat substantia nigra. *J Neurosci* 23:8237–8246.
- Harding JE, Charlton VE (1990) Effect of lactate and beta-hydroxybutyrate infusions on brain metabolism in the fetal sheep. *J Dev Physiol* 14:139–146.
- Hartman AL, Gasior M, Vining EP, Rogawski MA (2007) The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatr Neurol* 36:281–292.
- Herzberg GR, Gad M (1984) Evidence that the cytosolic activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase in chicken liver is L-3-hydroxyacid dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 802:67–70.
- Holmgren CD, Mukhtarov M, Malkov AE, Popova IY, Bregestovski P, Zilberman Y (2010) Energy substrate availability as a determinant of neuronal resting potential, GABA signaling and spontaneous network activity in the neonatal cortex *in vitro*. *J Neurochem* 112:900–912.
- Howard MA, Burger RM, Rubel EW (2007) A developmental switch to GABAergic inhibition dependent on increases in Kv1-type K⁺ currents. *J Neurosci* 27:2112–2123.
- Jarolimek W, Misgeld U, Lux HD (1989) Activity dependent alkaline and acid transients in guinea pig hippocampal slices. *Brain Res* 505:225–232.
- Jones MD Jr, Burd LI, Makowski EL, Meschia G, Battaglia FC (1975) Cerebral metabolism in sheep: a comparative study of the adult, the lamb, and the fetus. *Am J Physiol* 229:235–239.
- Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* 4:490–503.
- Kaila K (1994) Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42:489–537.
- Kaila K, Voipio J (1987) Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature* 330:163–165.
- Kaila K, Voipio J, Paalasmaa P, Pasternack M, Deisz RA (1993) The role of bicarbonate in GABA_A receptor-mediated IPSPs of rat neocortical neurons. *J Physiol* 464:273–289.
- Kandler K, Friauf E (1995) Development of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in the auditory brainstem of perinatal rats. *J Neurosci* 15:6890–6904.
- Kandler K, Kullmann PH, Ene FA, Kim G (2002) Excitatory action of an immature glycinergic/GABAergic sound localization pathway. *Physiol Behav* 77:583–587.
- Khalilov I, Esclapez M, Medina I, Aggoun D, Lamsa K, Leinekugel X, Khazipov R, Ben-Ari Y (1997) A novel *in vitro* preparation: the intact hippocampal formation. *Neuron* 19:743–749.
- Khalilov I, Holmes GL, Ben-Ari Y (2003) In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat Neurosci* 6:1079–1085.
- Kim Y, Trussell LO (2009) Negative shift in the glycine reversal potential mediated by a Ca²⁺- and pH-dependent mechanism in interneurons. *J Neurosci* 29:11495–11510.
- LaManna JC, Salem N, Puchowicz M, Erokwu B, Koppaka S, Flask C, Lee Z (2009) Ketones suppress brain glucose consumption. *Adv Exp Med Biol* 645:301–306.
- Lee H, Chen CX, Liu YJ, Aizenman E, Kandler K (2005) KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses. *Eur J Neurosci* 21:2593–2599.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA_A and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243–255.
- Leong SF, Clark JB (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes of energy metabolism. *Biochem J* 218:139–145.
- Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C (2002) Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci* 16:2358–2370.
- Liu Z, Neff RA, Berg DK (2006) Sequential interplay of nicotinic and GABAergic signaling guides neuronal development. *Science* 314:1610–1613.
- Löhrke S, Srinivasan G, Oberhofer M, Doncheva E, Friauf E (2005) Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action occurs at different perinatal ages in superior olfactory complex nuclei. *Eur J Neurosci* 22:2708–2722.
- Lust WD, Pundik S, Zechel J, Zhou Y, Buczak M, Selman WR (2003) Changing metabolic and energy profiles in fetal, neonatal, and adult rat brain. *Metab Brain Dis* 18:195–206.
- Maalouf M, Rho JM, Mattson MP (2009) The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain Res Rev* 59:293–315.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG (1999) Energy on demand. *Science* 283:496–497.
- Medina JM (1985) The role of lactate as an energy substrate for the brain during the early neonatal period. *Biol Neonate* 48:237–244.
- Mintun MA, Vlassenbroek AG, Rundle MM, Raichle ME (2004) Increased lactate/pyruvate ratio augments blood flow in physiologically activated human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:659–664.
- Moore TJ, Lione AP, Sugden MC, Regen DM (1976) Beta-hydroxybutyrate transport in rat brain: developmental and dietary modulations. *Am J Physiol* 230:619–630.
- Nehlig A (2004) Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:265–275.
- Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A (1993) Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol* 40:163–221.
- Novotny EJ Jr, Ariyan C, Mason GF, O'Reilly J, Haddad GG, Behar KL (2001) Differential increase in cerebral cortical glucose oxidative metabolism during rat postnatal development is greater *in vivo* than *in vitro*. *Brain Res* 888:193–202.
- Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF Jr (1967) Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 46:1589–1595.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to gaba than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715–727.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16:6414–6423.
- Page MA, Krebs HA, Williamson DH (1971) Activities of enzymes of

- ketone-body utilization in brain and other tissues of suckling rats. *Biochem J* 121:49–53.
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26:199–206.
- Pégrier JP, Ferré P, Girard J (1977) The effects of inhibition of fatty acid oxidation in suckling newborn rats. *Biochem J* 166:631–634.
- Pellerin L, Pellegrini G, Martin JL, Magistretti PJ (1998) Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3990–3995.
- Pierre K, Magistretti PJ, Pellerin L (2002) MCT2 is a major neuronal monocarboxylate transporter in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:586–595.
- Pozas E, Paco S, Soriano E, Aguado F (2008) Cajal-Retzius cells fail to trigger the developmental expression of the Cl^- extruding co-transporter KCC2. *Brain Res* 1239:85–91.
- Price TJ, Cervero F, de Koninck Y (2005) Role of cation-chloride cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem* 5:547–555.
- Rafiki A, Boulland JL, Halestrap AP, Ottersen OP, Bergersen L (2003) Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* 122:677–688.
- Rex A, Bert B, Fink H, Voigt JP (2009) Stimulus-dependent changes of extracellular glucose in the rat hippocampus determined by in vivo microdialysis. *Physiol Behav* 98:467–473.
- Reynolds A, Brustein E, Liao M, Mercado A, Babilonia E, Mount DB, Drapeau P (2008) Neurogenic role of the depolarizing chloride gradient revealed by global overexpression of KCC2 from the onset of development. *J Neurosci* 28:1588–1597.
- Rheims S, Minlebaev M, Ivanov A, Represa A, Khazipov R, Holmes GL, Ben-Ari Y, Zilberman Y (2008) Excitatory GABA in rodent developing neocortex *in vitro*. *J Neurophysiol* 100:609–619.
- Rheims S, Holmgren CD, Chazal G, Mulder J, Harkany T, Zilberman Y (2009) GABA action in immature neocortical neurons directly depends on the availability of ketone bodies. *J Neurochem* 110:1330–1338.
- Rho JM, Anderson GD, Donevan SD, White HS (2002) Acetoacetate, acetone, and dibenzylamine (a contaminant in L-(+)-beta-hydroxybutyrate) exhibit direct anticonvulsant actions *in vivo*. *Epilepsia* 43:358–361.
- Riekki R, Pavlov I, Tornberg J, Lauri SE, Airaksinen MS, Taira T (2008) Altered synaptic dynamics and hippocampal excitability but normal long-term plasticity in mice lacking hyperpolarizing GABA_A receptor-mediated inhibition in CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 99:3075–3089.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K^+/Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251–255.
- Rivera C, Voipio J, Kaila K (2005) Two developmental switches in GABAergic signalling: the K^+/Cl^- cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J Physiol* 562:27–36.
- Robinson AM, Williamson DH (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev* 60:143–187.
- Roos A, Boron WF (1981) Regulation of intracellular pH in barnacle muscle. *Kroc Found Ser* 15:205–219.
- Ruusuvuori E, Kirilkin I, Pandya N, Kaila K (2010) Spontaneous network events driven by depolarizing GABA action in neonatal hippocampal slices are not attributable to deficient mitochondrial energy metabolism. *J Neurosci* 30:15638–15642.
- Safiuolina VF, Fattorini G, Conti F, Cherubini E (2006) GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* 26:597–608.
- Sernagor E, Young C, Eglen SJ (2003) Developmental modulation of retinal wave dynamics: shedding light on the GABA saga. *J Neurosci* 23:7621–7629.
- Sipila ST, Huttunen K, Voipio J, Kaila K (2006) Intrinsic bursting of immature CA3 pyramidal neurons and consequent giant depolarizing potentials are driven by a persistent Na current and terminated by a slow Ca-activated K current. *Eur J Neurosci* 23:2330–2338.
- Sivakumaran S, Mohajerani MH, Cherubini E (2009) At immature mossy fiber-CA3 synapses, correlated presynaptic and postsynaptic activity persistently enhances GABA release and network excitability via BDNF and cAMP-dependent PKA. *J Neurosci* 29:2637–2647.
- Stil A, Liabeuf S, Jean-Xavier C, Brocard C, Viemari JC, Vinay L (2009) Developmental up-regulation of the potassium-chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience* 164:809–821.
- Sullivan PG, Dubé C, Dorenbos K, Steward O, Baram TZ (2003) Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death. *Ann Neurol* 53:711–717.
- Takata T, Okada Y (1995) Effects of deprivation of oxygen or glucose on the neural activity in the guinea pig hippocampal slice: intracellular recording study of pyramidal neurons. *Brain Res* 683:109–116.
- Takata T, Sakurai T, Yang B, Yokono K, Okada Y (2001) Effect of lactate on the synaptic potential, energy metabolism, calcium homeostasis and extracellular glutamate concentration in the dentate gyrus of the hippocampus from guinea-pig. *Neuroscience* 104:371–378.
- Takayama C, Inoue Y (2010) Developmental localization of potassium chloride co-transporter 2 (KCC2), GABA and vesicular GABA transporter (VGAT) in the postnatal mouse somatosensory cortex. *Neurosci Res* 67:137–148.
- Tanis JE, Bellemere A, Moresco JJ, Forbush B, Koelle MR (2009) The potassium chloride cotransporter KCC-2 coordinates development of inhibitory neurotransmission and synapse structure in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 29:9943–9954.
- Thio LL, Wong M, Yamada KA (2000) Ketone bodies do not directly alter excitatory or inhibitory hippocampal synaptic transmission. *Neurology* 54:325–331.
- Tsai YC, Chou YC, Wu AB, Hu CM, Chen CY, Chen FA, Lee JA (2006) Stereoselective effects of 3-hydroxybutyrate on glucose utilization of rat cardiomyocytes. *Life Sci* 78:1385–1391.
- Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Gozlan H, Aniksztajn L (1999) The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci* 19:10372–10382.
- Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R (2003) Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J Neurophysiol* 90:2964–2972.
- Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hübner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R (2006) Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* 314:1788–1792.
- Tyzio R, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R (2007) Timing of the developmental switch in GABA_A mediated signalling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings. *Epilepsia* 48:96–105.
- Tyzio R, Minlebaev M, Rheims S, Ivanov A, Jorquera I, Holmes GL, Zilberman Y, Ben-Ari Y, Khazipov R (2008) Postnatal changes in somatic gamma-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 27:2515–2528.
- Vannucci SJ, Simpson IA (2003) Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1127–E1134.
- Vassault A, Bonnefont JP, Specola N, Saudubray JM (1991) Lactate, pyruvate and ketone bodies. In: Techniques in diagnostic human biochemical genetics a laboratory manual (Home FA, ed), pp 285–308. New York: Wiley-Liss.
- Wada H, Okada Y, Uzuo T, Nakamura H (1998) The effects of glucose, mannose, fructose and lactate on the preservation of neural activity in the hippocampal slices from the guinea pig. *Brain Res* 788:144–150.
- Wang DD, Kriegstein AR (2008) GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* 28:5547–5558.
- Webber RJ, Edmond J (1977) Utilization of L-(+)-3-hydroxybutyrate, D-(-)-3-hydroxybutyrate, acetoacetate, and glucose for respiration and lipid synthesis in the 18-day-old rat. *J Biol Chem* 252:5222–5226.
- Woodin MA, Ganguly K, Poo MM (2003) Coincident pre- and postsynaptic activity modifies GABAergic synapses by postsynaptic changes in Cl^- transporter activity. *Neuron* 39:807–820.
- Yellen G (2008) Ketone bodies, glycolysis, and KATP channels in the mechanism of the ketogenic diet. *Epilepsia* 49 [Suppl 8]:80–82.
- Zhu L, Polley N, Mathews GC, Delpire E (2008) NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy Res* 79:201–212.
- Ziemann AE, Schnizler MK, Albert GW, Severson MA, Howard MA 3rd, Welsh MJ, Wemmie JA (2008) Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a. *Nat Neurosci* 11:816–822.

AQ: M

Article de revue

**Early NMDA receptor-driven waves of activity in the
developing neocortex: physiological or pathological
network oscillations?**

Camille Allene & Rosa Cossart

SYMPOSIUM REVIEW

Early NMDA receptor-driven waves of activity in the developing neocortex: physiological or pathological network oscillations?

Camille Allene and Rosa Cossart

INMED, INSERM U901, Université de la Méditerranée, Parc Scientifique de Luminy, BP.13, 13273 Marseille cedex 9, France

Several patterns of coherent activity have been described in developing cortical structures, thus providing a general framework for network maturation. A detailed timely description of network patterns at circuit and cell levels is essential for the understanding of pathogenic processes occurring during brain development. Disturbances in the expression timetable of this pattern sequence are very likely to affect network maturation. This review focuses on the maturation of coherent activity patterns in developing neocortical structures. It emphasizes the intrinsic and synaptic cellular properties that are unique to the immature neocortex and, in particular, the critical role played by extracellular glutamate in controlling network excitability and triggering synchronous network waves of activity.

(Received 17 July 2009; accepted after revision 10 November 2009; first published online 16 November 2009)

Corresponding author R. Cossart: Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Unité 01 Parc Scientifique de Luminy, Boîte Postale 13, Marseille 13273, France. Email: cossart@inmed.univ-mrs.fr

The immature brain is endowed with the ability to generate a variety of coherent activity patterns (O'Donovan *et al.* 1998; Roerig & Feller, 2000; Moody & Bosma, 2005; Khazipov & Luhmann, 2006; Ben-Ari *et al.* 2007). Several studies indicate that as development proceeds, synchronous neuronal activity displays changing dynamics and is controlled by distinct mechanisms (Syed *et al.* 2004; Khazipov & Luhmann, 2006; McCabe *et al.* 2006; Allene *et al.* 2008; Sibilla *et al.* 2009). These successive stages closely parallel the maturation of physiological and morphological cellular properties (Picken Bahrey & Moody, 2003; Moody & Bosma, 2005; Torborg & Feller, 2005; Guido, 2008; Sibilla *et al.* 2009). The neocortex is the structure for which probably the most compelling variety of network patterns have been described (Yuste *et al.* 1992; Kandler & Katz, 1998; Owens & Kriegstein, 1998; Garaschuk *et al.* 2000; Peinado, 2000; Voigt *et al.* 2001; Opitz *et al.* 2002; Corlew *et al.* 2004; Khazipov *et al.* 2004; Weissman *et al.* 2004; Adelsberger *et al.* 2005; Dupont *et al.* 2005; McCabe *et al.* 2006; Milh *et al.* 2007b). This variety not only reflects

an endogenous developmental programme, but also the multiplicity of experimental approaches and animal models used to study network oscillations. Hence, network patterns which were named differently because they were measured in different experimental conditions (e.g. *in vivo*

Rosa Cossart is currently leading a research group in the Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INSERM U901, Marseille, France). Her research interests focus on the maturation of functional cortical GABAergic microcircuits. She was not initially trained as a neurobiologist but as a physicist with a strong education in mathematics, studying engineering in the Ecole Centrale de Paris. In 2001, she obtained a PhD in biophysics at Paris VI University under the supervision of Dr C. Bernard in the laboratory directed by Dr Yehezkel Ben-Ari. She next pursued her research training as a postdoctoral fellow in Professor Rafael Yuste's laboratory at Columbia University (New York, USA). There she developed a novel approach to study network dynamics in brain slices that combines two-photon calcium imaging with online mathematical analysis and targeted electrophysiological recordings. Since 2002 she has been as a permanent research fellow in the Centre National de la Recherche Scientifique. She received in 2005 a 'Medaille de Bronze' from the CNRS, an award that recognizes her early research achievements.



This review was presented at a symposium on *Neurophysiology of inhibitory & excitatory amino acid receptors* which took place at the 11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Vienna, on 3 August 2009.

vs. *in vitro*, calcium imaging vs. electrophysiology, etc.) may actually refer to the same biological phenomenon. In an attempt to assign a function to each synchronous neuronal activity pattern it is therefore essential to review and compare their different mechanisms and conditions of observation. Cortical early network oscillations (cENOs) are large-scale oscillatory calcium waves occurring immediately after birth at low frequency and providing most of the coherent activity during the first postnatal week in the developing rodent neocortex (Garaschuk *et al.* 2000). These were described both *in vitro* and *in vivo* using imaging techniques (Garaschuk *et al.* 2000; Adelsberger *et al.* 2005) and more recently using electrophysiological approaches (Allene *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009). Many developmental network patterns are mediated by GABAergic transmission given its early excitatory actions and advanced maturation compared to glutamatergic synapses (Ben-Ari *et al.* 2007). Remarkably, cENOs were shown to be generated by the activation of NMDA receptors (NMDA-Rs) and are critically dependent on extracellular glutamate concentration (Garaschuk *et al.* 2000; Allene *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009). This feature imparts to the immature cerebral cortex a critical sensitivity to pathological transmitter accumulations. It also confers on glutamate a critical role in early cortical development. Furthermore, cENOs are preferentially observed under specific conditions such as mild anoxia. This observation questions the physiological relevance of cENOs. In this review, we will discuss the mechanisms, developmental profile and dynamics specific to cENOs in order to propose a relevant function for this network pattern and NMDA-R-driven oscillations in general during brain maturation.

A general sequence for the maturation of coherent activity patterns in cortical structures

Most developing peripheral and central neurons are spontaneously active. In the cortex, neuronal activity is associated with an intracellular calcium rise that can either be produced by a membrane potential depolarization measurable with electrophysiological approaches or be produced intracellularly without any electrical signature, although measurable with optical approaches (see Fig. 1). Spontaneous activity is further subdivided into uncorrelated and coherent activity patterns (see Fig. 1). Coherent electrical activity patterns progressively emerge during cortical development.

Calcium activity at embryonic stages consists of either uncorrelated membrane potential spikes (Komuro & Rakic, 1996; Crépel *et al.* 2007; Allene *et al.* 2008; Bortone & Polleux, 2009) or synchronous ‘non-electrical’ calcium rises (Owens & Kriegstein, 1998; Weissman *et al.* 2004; see Fig. 1). Embryonic calcium activity in cortical structures

has been suggested to play a role in the regulation of neurogenesis (Owens & Kriegstein, 1998; Weissman *et al.* 2004) in neuronal differentiation and migration (Komuro & Rakic, 1996; Bortone & Polleux, 2009). Primitive forms of activity in embryonic cortical structures are mostly uncorrelated calcium rises that participate in the maturation of intrinsic neuronal properties.

Around birth in rodents, neuronal activity becomes coherent in cortical structures. Several patterns of synchronous neuronal activity have been described (see Figs 1 and 2). With the exception of cortical domains (Yuste *et al.* 1992; Kandler & Katz, 1998), all of them are associated with electrical activity (see Fig. 1). There is a robust timetable in the mechanisms responsible for the synchronization of neuronal activity: population coherence first relies on gap-junction coupling and on the activation of intrinsic voltage-dependent conductances before becoming mostly synapse-driven (see Fig. 1). We have recently established in both the neocortex (Allene *et al.* 2008) and the hippocampus (Crépel *et al.* 2007) that the earliest coherent electrical activity pattern emerges at birth in the form of synchronous plateau assemblies (SPAs), so named because of their characteristic spatial–temporal dynamics: SPAs involve small groups of neurons producing synchronous calcium plateaus. Each calcium plateau is associated with sustained intrinsic membrane potential oscillations. SPAs are therefore a step of coherent electrical activity common to hippocampal and neocortical networks that precedes the emergence of synapse-driven network oscillations (Fig. 2).

At early postnatal stages, two spontaneous synapse-driven network patterns have been extensively described in developing neocortical slices: giant depolarizing potentials (GDPs) driven by GABAergic transmission (Ben-Ari *et al.* 1989; Garaschuk *et al.* 1998; Crépel *et al.* 2007; Allene *et al.* 2008; Rheims *et al.* 2008a) and cortical early network oscillations (cENOs) driven by glutamatergic transmission (Garaschuk *et al.* 2000; Corlew *et al.* 2004; McCabe *et al.* 2006; Allene *et al.* 2008). Relying on the apparent similarities between these patterns, cENOs were initially thought to be the neocortical counterpart of hippocampal GDPs. However, we have recently found that NMDA-R-driven ENOs and GABA_{AR}-driven GDPs are indeed two distinct patterns in the neocortex, characterized by different spatiotemporal dynamics both in electrical and optical recordings. Whereas cENOs are low-frequency oscillations (0.01 Hz) displaying slow kinetics that gradually involve the entire network, cGDPs are recurrent oscillations (0.1 Hz) that repetitively synchronize localized neuronal assemblies. Moreover, ENOs and cGDPs are sequentially expressed in the immature neocortex since cENOs precede cGDPs. Interestingly, a recent *in vivo* study describing the maturation of coordinated electrical activity patterns in

the rat somatosensory cortex has reported two patterns of oscillatory activity, 'spindle bursts' and 'long oscillations', with dynamics very similar to cGDPs and cENOS, respectively (Yang *et al.* 2009). It is therefore very likely

that the sequence established *in vitro* will also apply *in vivo* (Golshani *et al.* 2009).

What would be the main function carried by this precise sequence for the maturation of cortical networks? Given

		Age		
		Embryo	Perinatal	Postnatal
U N C O R R E L A T E D	Non-electrical	Owens & Kriegstein, 1998(<i>NC</i>)		
	Electrical	Komuro & Rakic, 1996(<i>CC</i>); Crépel <i>et al.</i> , 2007(<i>H</i>); Allene <i>et al.</i> , 2008(<i>NC</i>); Bortone & Polleux 2009(<i>NC</i>)		
C O R R E L A T E D	Non-electrical	Owens & Kriegstein, 1998(<i>NC</i>); Weissman <i>et al.</i> , 2004(<i>NC</i>)	Domains Yuste <i>et al.</i> , 1992(<i>NC</i>); Kandler & Katz, 1998(<i>NC</i>)	
	Non-synaptic		SPAs Crépel <i>et al.</i> , 2007(<i>H</i>); Allene <i>et al.</i> , 2008(<i>NC</i>)	
C O R R E L A T E D	Electrical		cENOS Garaschuck <i>et al.</i> , 2000(<i>NC & H</i>); Corlew <i>et al.</i> , 2004(<i>NC</i>); Adelsberger <i>et al.</i> , 2005(<i>NC</i>); McCabe <i>et al.</i> , 2006(<i>NC</i>); Allene <i>et al.</i> , 2008(<i>NC</i>); Yang <i>et al.</i> , 2009(<i>NC</i>)	cGDPs Ben-Ari <i>et al.</i> , 1989(<i>H</i>); Garaschuk <i>et al.</i> , 1998(<i>H</i>); Rheims <i>et al.</i> , 2008a(<i>NC</i>); Allene <i>et al.</i> , 2008(<i>NC</i>); Crépel <i>et al.</i> , 2007(<i>H</i>);
	Synaptic		Spindle bursts Khazipov <i>et al.</i> , 2004(<i>NC</i>); Sun & Luhmann, 2004(<i>NC</i>); Milh <i>et al.</i> , 2007b(<i>NC</i>); Yang <i>et al.</i> , 2009(<i>NC</i>); Golshani <i>et al.</i> , 2009(<i>NC</i>); Gamma oscillations Yang <i>et al.</i> , 2009(<i>NC</i>);	

Figure 1. Spontaneous activity patterns in the developing rodent cortex

NC: neocortex; CC: cerebellar cortex; H: hippocampus.

the largely documented role of activity in the maturation of cortical neurons (Moody & Bosma, 2005; Cancedda *et al.* 2007; Lin *et al.* 2008; Wang & Kriegstein, 2008) and circuits (Katz & Shatz, 1996; Huang, 2009; Pfeffer *et al.* 2009), it is easy to speculate that the robust timetable for the maturation of network patterns is not merely the emergent expression of a precise sequence in the development of individual neuronal properties but something that also participates in proper cell maturation. In other words, activity itself would create a feedback loop that triggers the changes in neuronal and circuit properties that serve to terminate one network pattern and start the next. Experiments selectively preventing the expression of a given network pattern within a precise sequence indirectly support this hypothesis.

This sequence is particularly well-documented in the maturing retina, a structure in which spontaneous retinal waves will develop in three stereotyped sequential steps characterized by different dynamics and mechanisms (Syed *et al.* 2004). While stage I waves are mostly mediated by gap-junction coupling, stage II and III rely on nicotinic and glutamatergic receptor activation,

respectively (Syed *et al.* 2004; Torborg & Feller, 2005). Waves at a given stage could be restored to the previous stage by blocking their specific neurotransmission system (McLaughlin *et al.* 2003; Syed *et al.* 2004; Stacy *et al.* 2005; Blankenship *et al.* 2009). For example, mice lacking the enzyme that synthesizes acetylcholine will exhibit stage I gap junction-dependent retinal waves at a period of development normally dominated by stage II cholinergic waves (Stacy *et al.* 2005). Similarly, at the next stage of retinal activity pattern maturation, an absence of glutamatergic signalling in VGLUT1 KO mice was shown to delay the termination of stage II waves (Blankenship *et al.* 2009). Also, $\beta 2-/-$ mice lacking the nicotinic receptor subunits mediating stage II waves will not display nicotinic-dependent correlated activity while stage III glutamatergic waves will begin earlier (McLaughlin *et al.* 2003). A precisely timed handover of synchrony between different network activity patterns also applies to the developing hippocampus (Crépel *et al.* 2007). Indeed, we have shown in this structure that the occurrence of synapse-driven GDPs actively shuts off the expression of the earlier gap-junction mediated SPA oscillations.

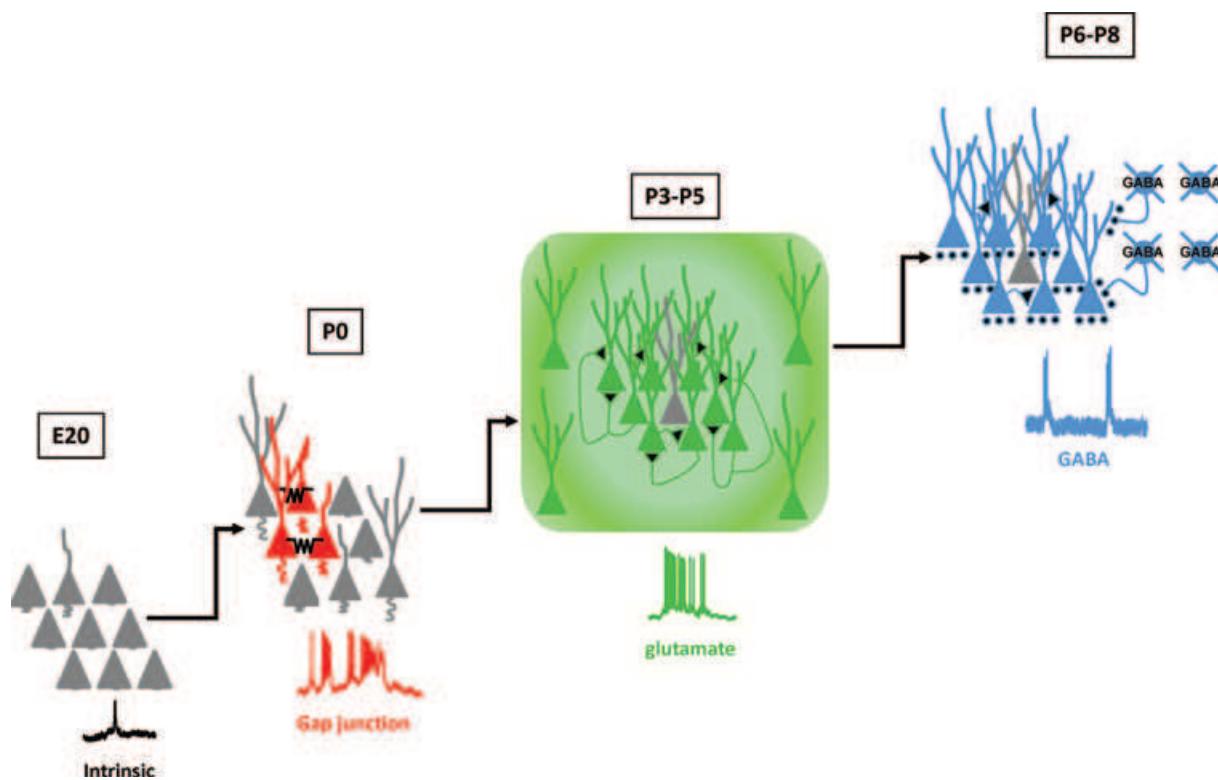


Figure 2. A general sequence for the maturation of coherent electrical activity patterns

Schematic representation of the sequential maturation of synchronized electrical activity patterns from late embryonic stages to the end of the first postnatal week in neocortical rodent slices (Allene *et al.* 2008). At embryonic stages electrical activity is uncorrelated. At birth it becomes synchronized through gap junctions and is supported by the activation of voltage-gated intrinsic conductances (SPAs). Later, network patterns are synapse-driven by glutamatergic (ENOs) or GABAergic (GDPs) transmission. Note that extrasynaptic glutamate receptors are also likely to be involved in the generation of ENOs. With the exception of ENOs, the same sequence was found in the developing hippocampus (Crépel *et al.* 2007).

Moreover these two patterns are mutually exclusive within the same network and blocking GDPs will restore SPAs during the first postnatal week (Crépel *et al.* 2007). It is possible that the activation of NMDA-Rs occurring during GDPs (Leinekugel *et al.* 1997) could produce a long-term down-regulation of connexin expression (Arumugam *et al.* 2005) that would silence SPAs. The handover of synchrony and direct interaction between SPAs, ENOs and GDPs has not yet been investigated in the neocortex. It is therefore at present difficult to claim whether a similar direct interaction between co-existing patterns also applies to the neocortex.

If such a precise timetable for synchronous neuronal activity maturation applies to the neocortex, it implies that a proper maturation of cortical structures will be highly sensitive to environmental factors. Indeed, coherent activity patterns can be largely modulated by

environmental factors. For example, both in the neocortex and hippocampus, the emergence of SPAs is determined by the hormone oxytocin, which is released by the mother during delivery (Crépel *et al.* 2007; Allene *et al.* 2008). The effect of oxytocin on SPAs directly results from the action of the hormone on GABAergic transmission (Tyzio *et al.* 2006) since SPAs were shown to be favoured by an inhibitory GABA polarity, for example produced by NKCC1 blockade (Crépel *et al.* 2007). Hence, the same environmental change (i.e. oxytocin release) will create conditions that favour the emergence of SPAs but prevent GDPs. Interestingly, it is worth mentioning that probably several other environmental factors, including stress (Shen *et al.* 2007) and energy supply (Rheims *et al.* 2008b), will also ultimately impact network activity patterns by their direct action on the GABAergic system. In fact, we have shown that an anoxic episode occurring in a given network

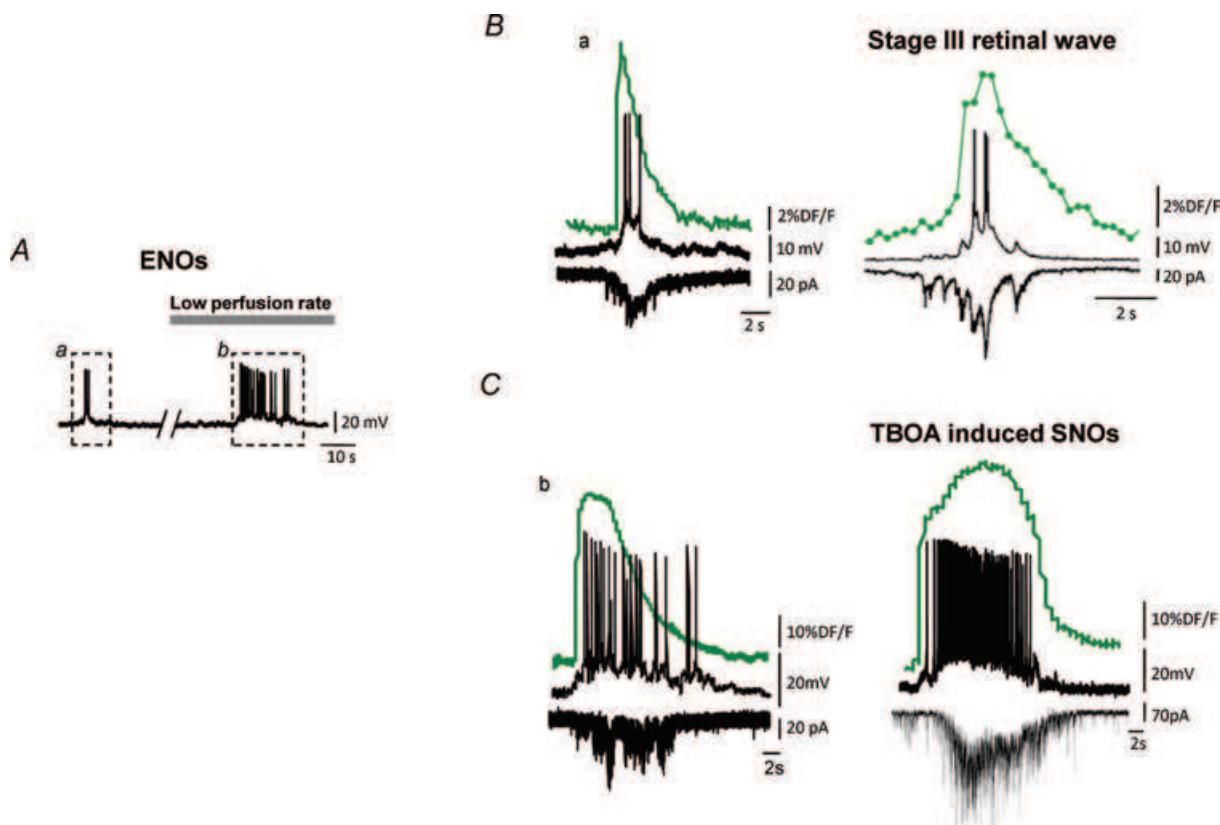


Figure 3. ENOs present striking similarities with both a physiological and a pathological network pattern

A, ENO-associated membrane potential depolarisations recorded in current clamp mode before (a) and after (b) decreasing the rate of the perfusion from 4 to 1 ml min⁻¹ (data taken from Allene *et al.* 2008). Similar effects were found in anoxic/aglycaemic perfusion conditions (see Allene *et al.* 2008). B, comparison between the membrane potential depolarization (top black trace), the calcium fluorescence signal (green) and the spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs, bottom black, $V_m = -60$ mV) associated with the spontaneous ENO illustrated in (Aa) and with a stage III retinal wave (reprinted from Blankenship *et al.* (2009) with permission from Elsevier). Note the similarity between the two patterns. C, same as in B but comparing ENOs produced by a mild anoxic condition occurring when decreasing the perfusion rate (Ab) with slow network oscillations (SNOs) induced by pharmacological EEAT blockade with DL-TBOA (unpublished data from L. Aniksztajn & A.A. Cattani).

will boost the occurrence of cENOs while preventing the emergence of GDPs, the later network oscillation (Fig. 3; Allene *et al.* 2008). This differential sensitivity of network patterns to environmental factors is directly determined by the cellular mechanism underlying their generation. In conclusion, the same environmental change can have different consequences on the network depending on which type of activity is dominant at the time it occurs.

NMDA-R driven early network oscillations: a role in synapse maturation?

As discussed above, ENOs are the dominant network pattern in neocortical slices at early postnatal stages. In contrast to most synapse-driven oscillations in other developing structures including the hippocampus, ENOs are mediated by the activation of NMDA-Rs rather than GABA_A-Rs (Garaschuk *et al.* 2000; Dupont *et al.* 2005; McCabe *et al.* 2006; Sun & Luhmann, 2007; Allene *et al.* 2008). Accordingly, oscillations recorded *in vivo* in the neonatal rat barrel cortex are also largely dependent on NMDA-R activation (Minlebaev *et al.* 2007; Yang *et al.* 2009). Therefore NMDA-Rs specifically have a major network function at early developmental stages in the neocortex. In contrast, in the hippocampus, GABAergic synapses are established before glutamatergic ones (Ben-Ari *et al.* 2004). Accordingly, the first synapse-driven network pattern in this region is the GABA_A-R-driven GDPs. The sequence of synapse maturation in the neocortex might be different even though GABAergic transmission also critically modulates neocortical activity through its complex excitatory/shunting action (Rheims *et al.* 2008a). Several observations indicate that NMDA-R signalling operates early in cortical development, notably to regulate the synaptic recruitment of AMPA-Rs (Feldmeyer & Cull-Candy, 1996; Zhu *et al.* 2000; Shi *et al.* 2001; Radnikow *et al.* 2002; Voigt *et al.* 2005; Brill & Huguenard, 2008; Wang & Kriegstein, 2008). A detailed morpho-functional description of the sequential maturation of GABAergic and glutamatergic synapses in the neocortex will undoubtedly be helpful to understand the differences between the neocortex and hippocampus.

It is important to stress that the network function of NMDA-Rs in the neocortex does not necessarily imply synaptic activation of these receptors. Indeed, we have recently shown that NMDA-Rs also contribute to neuronal excitability in the neocortex by mediating a tonic current that supports membrane potential depolarization (Allene *et al.* 2008). In the same study, we established the critical involvement of extracellular glutamate concentrations in the generation of cENOs. It is therefore possible that the generation of cENOs partly originates in the activation of extrasynaptic NMDA-Rs by ambient glutamate (Allene *et al.* 2008). The analogy between retinal and neocortical

activity patterns is striking, in particular regarding the involvement of extrasynaptic glutamate receptors. Indeed, increases in ambient levels of glutamate were recently shown to be critically involved in generating stage III retinal waves (Blankenship *et al.* 2009). In addition, the dynamics underlying NMDA-R-driven stage III retinal waves is remarkably similar to cortical ENOs (Blankenship *et al.* 2009). The kinetics of both calcium and electrophysiological events associated with stage III retinal waves are as slow as those occurring during cENOs (Fig. 3). Interestingly, stage III retinal waves were shown to appear at a period when the glutamatergic synaptic system is not yet mature in the retina (Syed *et al.* 2004; Blankenship *et al.* 2009) supporting a role for extrasynaptic NMDA-R activation in the maturation of synaptic circuits.

Cortical ENOs may support the conversion of 'silent' to 'active' synapses and regulate the recruitment of AMPA-Rs into functional synapses. Indeed this network pattern occurs just before the shift of 'silent' or 'labile' synapses to functional ones (Groc *et al.* 2006) and glutamate spillover was shown to be critical for the activation of 'silent synapses' (Balland *et al.* 2008). In agreement with this hypothesis, it was recently shown that GABA_A-R and NMDA-R synaptic currents can be recorded prior to AMPA-R EPSCs in the neocortex and jointly contribute to the development of AMPA-R mediated transmission (Wang & Kriegstein, 2008). Still, the regulation of AMPA-Rs by NMDA-R-driven ENOs is probably not so straightforward. Indeed, while some reports suggested that NMDA-R signalling early in development negatively regulates the recruitment of functional AMPA-Rs into synapses (Hall & Ghosh, 2008), others proposed a positive regulation of AMPA-Rs by NMDA-R-mediated transmission (Zhu *et al.* 2000; Shi *et al.* 2001; Voigt *et al.* 2005; Brill & Huguenard, 2008). In fact, this controversy belongs to a more general one, as other studies have indicated that the maturation of these two types of receptors might be independent (Meguro *et al.* 1992; Okabe *et al.* 1998; Zhu & Malinow, 2002; Colonnese *et al.* 2003). This debate underlies the complex role of NMDA-R signalling during development and makes it difficult to attribute a single function to early NMDA-R-driven oscillations.

The developing neocortex: a network in a 'critical state'?

ENO dynamics are characterized by a massive recruitment of neuronal populations throughout cortical subregions irrespective of anatomical boundaries (Garaschuk *et al.* 2000; Adelsberger *et al.* 2005; Yang *et al.* 2009). Interestingly, during a restricted developmental period of 1 or 2 days, these large synchronizations co-exist with local events in the form of GDPs (Allene *et al.* 2008). The

coexistence of these two network events with very different sizes could be the sign of an ‘avalanche’ mode of activity in developing neocortical slices (Plenz & Thiagarajan, 2007; Werner, 2007). The term ‘neuronal avalanche’ was recently introduced to describe the fact that the size of spontaneous neuronal synchronizations can follow a power-law distribution implying that both rare massive events and frequent local ones can occur in the same network (Plenz & Thiagarajan, 2007; Werner, 2007). An avalanche type of organization is the sign of a network in a critical state and was reported in immature organotypic cortical cultures (Stewart & Plenz, 2008).

By definition, a critical state is at the edge of stability, and any small perturbation would break it. Several observations could indeed indicate that network dynamics in the developing neocortex can rapidly switch to a pathological state. Maybe the most striking one is the fact that the neocortex is exceptionally prone to seizures at early developmental stages (Ben-Ari & Holmes, 2006; Bender & Baram, 2007; Holmes *et al.* 2007; Scantlebury *et al.* 2007). For example, it was recently shown that GDPs in that region rapidly evolve towards interictal and ictal-like seizures if synaptic activity levels are pharmacologically increased (Rheims *et al.* 2008b). Likewise, the blockade of excitatory amino acid transporters (EAAT) that remove glutamate from the extracellular space induces an epileptiform ‘suppression burst’ activity pattern (Demarque *et al.* 2004). These slow network oscillations (SNOs) induced by EAAT blockade share striking features with hypoxia-induced-ENOs (Allene *et al.* 2008) regarding their dynamics and mechanisms (Fig. 3). SNOs appear as an amplified form of ENOs in regard to individual event kinetics and network dynamics. Interestingly, hypoxic–ischaemic encephalopathy in human neonates is very often associated with discontinuous EEG patterns including ‘suppression bursts’, in which dynamics and suggested cellular mechanisms can also be intriguingly similar to cENOs (Biagioli *et al.* 1999; Ohtahara & Yamatogi, 2003; Milh *et al.* 2007a). Moreover, hypoxic conditions both facilitate ENOs (Allene *et al.* 2008) and impair glutamate transporter function (Dallas *et al.* 2007). Altogether, this would suggest that ENOs could be a network pattern critically close to a pathological state.

To conclude, we propose a robust sequence for the maturation of coherent activity patterns in cortical structures with the role of NMDA-R driven ENOs remaining an open question. Because of their resemblance to both physiological patterns like stage III retinal waves or neuronal avalanches, and pathological oscillations like the bursts induced by an impairment of EAAT, it is at present difficult to assign a definite developmental function to ENOs. Finding the *in vivo* electrical pattern corresponding to cENOs is a difficult task. It will require combining multineuron imaging with electro-

physiological recordings but it will certainly help to address this issue.

References

- Adelsberger H, Garaschuk O & Konnerth A (2005). Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci* **8**, 988–990.
- Allene C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y & Cossart R (2008). Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J Neurosci* **28**, 12851–12863.
- Arumugam H, Liu X, Colombo PJ, Corriveau RA & Belousov AB (2005). NMDA receptors regulate developmental gap junction uncoupling via CREB signalling. *Nat Neurosci* **8**, 1720–1726.
- Balland B, Lachamp P, Kessler JP & Tell F (2008). Silent synapses in developing rat nucleus tractus solitarius have AMPA receptors. *J Neurosci* **28**, 4624–4634.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R & Gaiarsa JL (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* **416**, 303–325.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R & Khazipov R (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* **87**, 1215–1284.
- Ben-Ari Y & Holmes GL (2006). Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol* **5**, 1055–1063.
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Represa A & Gozlan H (2004). Interneurons set the tune of developing networks. *Trends Neurosci* **27**, 422–427.
- Bender RA & Baram TZ (2007). Epileptogenesis in the developing brain: what can we learn from animal models? *Epilepsia* **48**(Suppl 5), 2–6.
- Biagioli E, Bartalena L, Boldrini A, Pieri R & Cioni G (1999). Constantly discontinuous EEG patterns in full-term neonates with hypoxic–ischaemic encephalopathy. *Clin Neurophysiol* **110**, 1510–1515.
- Blankenship AG, Ford KJ, Johnson J, Seal RP, Edwards RH, Copenhagen DR & Feller MB (2009). Synaptic and extrasynaptic factors governing glutamatergic retinal waves. *Neuron* **62**, 230–241.
- Bortone D & Polleux F (2009). KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* **62**, 53–71.
- Brill J & Huguenard JR (2008). Sequential changes in AMPA receptor targeting in the developing neocortical excitatory circuit. *J Neurosci* **28**, 13918–13928.
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K & Poo MM (2007). Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons *in vivo*. *J Neurosci* **27**, 5224–5235.
- Colonnesse MT, Shi J & Constantine-Paton M (2003). Chronic NMDA receptor blockade from birth delays the maturation of NMDA currents, but does not affect AMPA/kainate currents. *J Neurophysiol* **89**, 57–68.
- Corlew R, Bosma MM & Moody WJ (2004). Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *J Physiol* **560**, 377–390.

- Crépel V, Aronov D, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y & Cossart R (2007). A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* **54**, 105–120.
- Dallas M, Boycott HE, Atkinson L, Miller A, Boyle JP, Pearson HA & Peers C (2007). Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *J Neurosci* **27**, 3946–3955.
- Demarque M, Villeneuve N, Manent JB, Becq H, Represa A, Ben-Ari Y & Aniksztejn L (2004). Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. *J Neurosci* **24**, 3289–3294.
- Dupont E, Hangartner IL, Kilb W, Hirsch S & Luhmann HJ (2005). Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* **439**, 79–83.
- Feldmeyer D & Cull-Candy S (1996). Functional consequences of changes in NMDA receptor subunit expression during development. *J Neurocytol* **25**, 857–867.
- Garaschuk O, Hanse E & Konnerth A (1998). Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol* **507**, 219–236.
- Garaschuk O, Linn J, Eilers J & Konnerth A (2000). Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* **3**, 452–459.
- Golshani P, Goncalves JT, Khoshkhoo S, Mostany R, Smirnakis S & Portera-Cailliau C (2009). Internally mediated developmental desynchronization of neocortical network activity. *J Neurosci* **29**, 10890–10899.
- Groc L, Gustafsson B & Hanse E (2006). AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there! *Trends Neurosci* **29**, 132–139.
- Guido T (2008). Refinement of the retinogeniculate pathway. *J Physiol* **586**, 4357–4362.
- Hall BJ & Ghosh A (2008). Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses. *Trends Neurosci* **31**, 82–89.
- Holmes GL, Harden C, Liporace J & Gordon J (2007). Postnatal concerns in children born to women with epilepsy. *Epilepsy Behav* **11**, 270–276.
- Huang ZJ (2009). Activity-dependent development of inhibitory synapses and innervation pattern: role of GABA signalling and beyond. *J Physiol* **587**, 1881–1888.
- Kandler K & Katz LC (1998). Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci* **18**, 1419–1427.
- Katz LC & Shatz CJ (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* **274**, 1133–1138.
- Khazipov R & Luhmann HJ (2006). Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci* **29**, 414–418.
- Khazipov R, Sirota A, Leinekugel X, Holmes GL, Ben-Ari Y & Buzsaki G (2004). Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* **432**, 758–761.
- Komuro H & Rakic P (1996). Intracellular Ca^{2+} fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron* **17**, 275–285.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y & Khazipov R (1997). Ca^{2+} oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA_A and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* **18**, 243–255.
- Lin Y, Bloodgood BL, Hauser JL, Lapan AD, Koon AC, Kim TK, Hu LS, Malik AN & Greenberg ME (2008). Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. *Nature* **455**, 1198–1204.
- McCabe AK, Chisholm SL, Pickering-Bahrey HL & Moody WJ (2006). The self-regulating nature of spontaneous synchronized activity in developing mouse cortical neurones. *J Physiol* **577**, 155–167.
- McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB & O'Leary DD (2003). Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron* **40**, 1147–1160.
- Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K & Mishina M (1992). Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* **357**, 70–74.
- Milh M, Becq H, Villeneuve N, Ben-Ari Y & Aniksztejn L (2007a). Inhibition of glutamate transporters results in a 'suppression-burst' pattern and partial seizures in the newborn rat. *Epilepsia* **48**, 169–174.
- Milh M, Kaminska A, Huon C, Lapillonne A, Ben-Ari Y & Khazipov R (2007b). Rapid cortical oscillations and early motor activity in premature human neonate. *Cereb Cortex* **17**, 1582–1594.
- Minlebaev M, Ben-Ari Y & Khazipov R (2007). Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex in vivo. *J Neurophysiol* **97**, 692–700.
- Moody WJ & Bosma MM (2005). Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* **85**, 883–941.
- O'Donovan MJ, Wenner P, Chub N, Tabak J & Rinzel J (1998). Mechanisms of spontaneous activity in the developing spinal cord and their relevance to locomotion. *Ann NY Acad Sci* **860**, 130–141.
- Ohtahara S & Yamatogi Y (2003). Epileptic encephalopathies in early infancy with suppression-burst. *J Clin Neurophysiol* **20**, 398–407.
- Okabe S, Vicario-Abejon C, Segal M & McKay RD (1998). Survival and synaptogenesis of hippocampal neurons without NMDA receptor function in culture. *Eur J Neurosci* **10**, 2192–2198.
- Opitz T, de Lima AD & Voigt T (2002). Spontaneous development of synchronous oscillatory activity during maturation of cortical networks in vitro. *J Neurophysiol* **88**, 2196–2206.
- Owens DF & Kriegstein AR (1998). Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J Neurosci* **18**, 5374–5388.
- Peinado A (2000). Traveling slow waves of neural activity: a novel form of network activity in developing neocortex. *J Neurosci* **20**, RC54.

- Pfeffer CK, Stein V, Keating DJ, Maier H, Rinke I, Rudhard Y, Hentschke M, Rune GM, Jentsch TJ & Hubner CA (2009). NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development. *J Neurosci* **29**, 3419–3430.
- Picken Bahrey HL & Moody WJ (2003). Early development of voltage-gated ion currents and firing properties in neurons of the mouse cerebral cortex. *J Neurophysiol* **89**, 1761–1773.
- Plenz D & Thiagarajan TC (2007). The organizing principles of neuronal avalanches: cell assemblies in the cortex? *Trends Neurosci* **30**, 101–110.
- Radnikow G, Feldmeyer D & Lubke J (2002). Axonal projection, input and output synapses, and synaptic physiology of Cajal-Retzius cells in the developing rat neocortex. *J Neurosci* **22**, 6908–6919.
- Rheims S, Minlebaev M, Ivanov A, Represa A, Khazipov R, Holmes GL, Ben-Ari Y & Zilberman Y (2008a). Excitatory GABA in rodent developing neocortex in vitro. *J Neurophysiol* **100**, 609–619.
- Rheims S, Represa A, Ben-Ari Y & Zilberman Y (2008b). Layer-specific generation and propagation of seizures in slices of developing neocortex: role of excitatory GABAergic synapses. *J Neurophysiol* **100**, 620–628.
- Roerig B & Feller MB (2000). Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 86–114.
- Scantlebury MH, Heida JG, Hasson HJ, Veliskova J, Velisek L, Galanopoulou AS & Moshe SL (2007). Age-dependent consequences of status epilepticus: animal models. *Epilepsia* **48**(Suppl 2), 75–82.
- Shen H, Gong QH, Aoki C, Yuan M, Ruderman Y, Dattilo M, Williams K & Smith SS (2007). Reversal of neurosteroid effects at $\alpha 4\beta 2\delta$ GABA_A receptors triggers anxiety at puberty. *Nat Neurosci* **10**, 469–477.
- Shi J, Aamodt SM, Townsend M & Constantine-Paton M (2001). Developmental depression of glutamate neurotransmission by chronic low-level activation of NMDA receptors. *J Neurosci* **21**, 6233–6244.
- Sibilla S, Fabbro A, Grandolfo M, D'Andrea P, Nistri A & Ballerini L (2009). The patterns of spontaneous Ca²⁺ signals generated by ventral spinal neurons in vitro show time-dependent refinement. *Eur J Neurosci* **29**, 1543–1559.
- Stacy RC, Demas J, Burgess RW, Sanes JR & Wong RO (2005). Disruption and recovery of patterned retinal activity in the absence of acetylcholine. *J Neurosci* **25**, 9347–9357.
- Stewart CV & Plenz D (2008). Homeostasis of neuronal avalanches during postnatal cortex development in vitro. *J Neurosci Methods* **169**, 405–416.
- Sun JJ & Luhmann HJ (2007). Spatio-temporal dynamics of oscillatory network activity in the neonatal mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* **26**, 1995–2004.
- Syed MM, Lee S, Zheng J & Zhou ZJ (2004). Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina. *J Physiol* **560**, 533–549.
- Torborg CL & Feller MB (2005). Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. *Prog Neurobiol* **76**, 213–235.
- Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hubner CA, Represa A, Ben-Ari Y & Khazipov R (2006). Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signalling in the fetal brain during delivery. *Science* **314**, 1788–1792.
- Voigt T, Opitz T & de Lima AD (2001). Synchronous oscillatory activity in immature cortical network is driven by GABAergic preplate neurons. *J Neurosci* **21**, 8895–8905.
- Voigt T, Opitz T & de Lima AD (2005). Activation of early silent synapses by spontaneous synchronous network activity limits the range of neocortical connections. *J Neurosci* **25**, 4605–4615.
- Wang DD & Kriegstein AR (2008). GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* **28**, 5547–5558.
- Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC & Kriegstein AR (2004). Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* **43**, 647–661.
- Werner G (2007). Brain dynamics across levels of organization. *J Physiol Paris* **101**, 273–279.
- Yang JW, Hangartner IL, Sun JJ & Luhmann HJ (2009). Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks in vivo. *J Neurosci* **29**, 9011–9025.
- Yuste R, Peinado A & Katz LC (1992). Neuronal domains in developing neocortex. *Science* **257**, 665–669.
- Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y & Malinow R (2000). Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* **3**, 1098–1106.
- Zhu JJ & Malinow R (2002). Acute versus chronic NMDA receptor blockade and synaptic AMPA receptor delivery. *Nat Neurosci* **5**, 513–514.

Reference List

- Adcock KH, Brown DJ, Shearer MC, Shewan D, Schachner M, Smith GM, Geller HM, Fawcett JW (2004) Axon behaviour at Schwann cell - astrocyte boundaries: manipulation of axon signalling pathways and the neural adhesion molecule L1 can enable axons to cross. *Eur J Neurosci* 20:1425-1435.
- Adelsberger H, Garaschuk O, Konnerth A (2005) Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci* 8:988-990.
- Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, chi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H (2009) Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J Neurosci* 29:13720-13729.
- Ahuja TK, Wu SH (2000) Developmental changes in physiological properties in the rat's dorsal nucleus of the lateral lemniscus. *Hear Res* 149:33-45.
- Allene C, Cattani A, Ackman JB, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Cossart R (2008) Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J Neurosci* 28:12851-12863.
- Allene C, Cossart R (2009) Early NMDA-R-driven waves of activity in the developing neocortex: physiological or pathological network oscillations? *J Physiol*.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278:474-476.
- Ascoli GA, et al. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557-568.
- Atwood HL, Wojtowicz JM (1999) Silent synapses in neural plasticity: current evidence. *Learn Mem* 6:542-571.
- Badio B, Daly JW (1994) Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. *Mol Pharmacol* 45:563-569.
- Balland B, Lachamp P, Kessler JP, Tell F (2008) Silent synapses in developing rat nucleus tractus solitarius have AMPA receptors. *J Neurosci* 28:4624-4634.
- Baloyannis SJ, Karakatsanis K, Karathanasis J, Apostolakis M, Diacoyannis A (1983) Effects of GABA, glycine, and sodium barbiturate on dendritic growth in vitro. *Acta Neuropathol* 59:171-182.
- Banker TG, McBain CJ (2006) GABAergic input onto CA3 hippocampal interneurons remains shunting throughout development. *J Neurosci* 26:11720-11725.
- Banks GB, Kanjhan R, Wiese S, Kneussel M, Wong LM, O'Sullivan G, Sendtner M, Bellingham MC, Betz H, Noakes PG (2005) Glycinergic and GABAergic synaptic activity differentially regulate motoneuron survival and skeletal muscle innervation. *J Neurosci* 25:1249-1259.

Bansal A, Singer JH, Hwang BJ, Xu W, Beaudet A, Feller MB (2000) Mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits exhibit dramatically altered spontaneous activity patterns and reveal a limited role for retinal waves in forming ON and OFF circuits in the inner retina. *J Neurosci* 20:7672-7681.

Barahona M, Pecora LM (2002) Synchronization in small-world systems. *Phys Rev Lett* 89:054101.

Barbin G, Pollard H, Gaiarsa JL, Ben Ari Y (1993) Involvement of GABA_A receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 152:150-154.

Bark C, Bellinger FP, Kaushal A, Mathews JR, Partridge LD, Wilson MC (2004) Developmentally regulated switch in alternatively spliced SNAP-25 isoforms alters facilitation of synaptic transmission. *J Neurosci* 24:8796-8805.

Barria A, Malinow R (2002) Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35:345-353.

Bartos M, Vida I, Frotscher M, Meyer A, Monyer H, Geiger JR, Jonas P (2002) Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13222-13227.

Batista-Brito R, Fishell G (2009) The developmental integration of cortical interneurons into a functional network. *Curr Top Dev Biol* 87:81-118.

Behar TN, Li YX, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL (1996) GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 16:1808-1818.

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL (2000) GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex* 10:899-909.

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, O'Connell C, Barker JL (1998) Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. *J Neurosci* 18:6378-6387.

Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci* 19:4449-4461.

Belleau ML, Warren RA (2000) Postnatal development of electrophysiological properties of nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol* 84:2204-2216.

Ben Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24:353-360.

Ben Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303-325.

Ben Ari Y, Tseeb V, Ragozzino D, Khazipov R, Gaiarsa JL (1994) gamma-Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog Brain Res* 102:261-273.

Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87:1215-1284.

Ben-Ari Y, Holmes GL (2006) Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurology* 5:1055-1063.

Ben-Ari Y, Spitzer NC (2010) Phenotypic checkpoints regulate neuronal development. *Trends Neurosci*.

Bender RA, Baram TZ (2007) Epileptogenesis in the developing brain: What can we learn from animal models? *Epilepsia* 48:2-6.

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* 395:645-648.

Biagioli E, Bartalena L, Boldrini A, Pieri R, Cioni G (1999) Constantly discontinuous EEG patterns in full-term neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Clin Neurophysiol* 110:1510-1515.

Binshtok AM, Fleidervish IA, Sprengel R, Gutnick MJ (2006) NMDA receptors in layer 4 spiny stellate cells of the mouse barrel cortex contain the NR2C subunit. *J Neurosci* 26:708-715.

Binzegger T, Douglas RJ, Martin KA (2004) A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. *J Neurosci* 24:8441-8453.

Bisti S, Gargini C, Chalupa LM (1998) Blockade of glutamate-mediated activity in the developing retina perturbs the functional segregation of ON and OFF pathways. *J Neurosci* 18:5019-5025.

Blankenship AG, Feller MB (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 11:18-29.

Blankenship AG, Ford KJ, Johnson J, Seal RP, Edwards RH, Copenhagen DR, Feller MB (2009) Synaptic and extrasynaptic factors governing glutamatergic retinal waves. *Neuron* 62:230-241.

Blue ME, Parnavelas JG (1983) The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *J Neurocytol* 12:697-712.

Boccaletti S, Latora V, Moreno Y, Chavez M, Hwang D-U (2006) Complex Networks: Structure and dynamics. *Physics Reports* 424:175-308.

Bodnarenko SR, Chalupa LM (1993) Stratification of ON and OFF ganglion cell dendrites depends on glutamate-mediated afferent activity in the developing retina. *Nature* 364:144-146.

Bolshakov VY, Siegelbaum SA (1995) Regulation of hippocampal transmitter release during development and long-term potentiation. *Science* 269:1730-1734.

Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24:7623-7631.

- Bonifazi P, Goldin M, Picardo MA, Jorquera I, Cattani A, Bianconi G, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R (2009) GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* 326:1419-1424.
- Borodinsky LN, Root CM, Cronin JA, Sann SB, Gu X, Spitzer NC (2004) Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature* 429:523-530.
- Borodinsky LN, Spitzer NC (2007) Activity-dependent neurotransmitter-receptor matching at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:335-340.
- Bortone D, Polleux F (2009) KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* 62:53-71.
- Brecht M, Schneider M, Sakmann B, Margrie TW (2004) Whisker movements evoked by stimulation of single pyramidal cells in rat motor cortex. *Nature* 427:704-710.
- Brill J, Huguenard JR (2008) Sequential changes in AMPA receptor targeting in the developing neocortical excitatory circuit. *J Neurosci* 28:13918-13928.
- Bureau I, Shepherd GM, Svoboda K (2004) Precise development of functional and anatomical columns in the neocortex. *Neuron* 42:789-801.
- Buss RR, Gould TW, Ma J, Vinsant S, Prevette D, Winseck A, Toops KA, Hammarback JA, Smith TL, Oppenheim RW (2006) Neuromuscular development in the absence of programmed cell death: phenotypic alteration of motoneurons and muscle. *J Neurosci* 26:13413-13427.
- Buss RR, Oppenheim RW (2004) Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. *Anat Sci Int* 79:191-197.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48:591-604.
- Butts DA, Feller MB, Shatz CJ, Rokhsar DS (1999) Retinal waves are governed by collective network properties. *J Neurosci* 19:3580-3593.
- Buxhoeveden DP, Casanova MF (2002) The minicolumn hypothesis in neuroscience. *Brain* 125:935-951.
- Buzsaki G (2004) Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 7:446-451.
- Callaway EM, Lieber JL (1996) Development of axonal arbors of layer 6 pyramidal neurons in ferret primary visual cortex. *J Comp Neurol* 376:295-305.
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K, Poo MM (2007) Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci* 27:5224-5235.
- Cano-Abad MF, Villarroya M, Garcia AG, Gabilan NH, Lopez MG (2001) Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J Biol Chem* 276:39695-39704.

Canty AJ, Dietze J, Harvey M, Enomoto H, Milbrandt J, Ibanez CF (2009) Regionalized loss of parvalbumin interneurons in the cerebral cortex of mice with deficits in GFRalpha1 signaling. *J Neurosci* 29:10695-10705.

Cardin JA, Carlen M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459:663-667.

Carmignoto G, Vicini S (1992) Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. *Science* 258:1007-1011.

Carter AG, Regehr WG (2000) Prolonged synaptic currents and glutamate spillover at the parallel fiber to stellate cell synapse. *J Neurosci* 20:4423-4434.

Catalano SM, Shatz CJ (1998) Activity-dependent cortical target selection by thalamic axons. *Science* 281:559-562.

Catania KC, Remple MS (2002) Somatosensory cortex dominated by the representation of teeth in the naked mole-rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5692-5697.

Cattani AA, Bonfardin VD, Represa A, Ben-Ari Y, Aniksztejn L (2007) Generation of slow network oscillations in the developing rat hippocampus after blockade of glutamate uptake. *J Neurophysiol* 98:2324-2336.

Chagnac-Amitai Y, Connors BW (1989) Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol* 61:747-758.

Chandrasekaran AR, Plas DT, Gonzalez E, Crair MC (2005) Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse. *J Neurosci* 25:6929-6938.

Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Wu CZ, Knott G, Kuhlman S, Fu Y, Palmiter RD, Huang ZJ (2007) GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* 54:889-903.

Chavis P, Westbrook G (2001) Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411:317-321.

Chenn A, Walsh CA (2002) Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297:365-369.

Chitwood RA, Hubbard A, Jaffe DB (1999) Passive electrotonic properties of rat hippocampal CA3 interneurones. *J Physiol* 515 (Pt 3):743-756.

Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.

Chub N, O'Donovan MJ (1998) Blockade and recovery of spontaneous rhythmic activity after application of neurotransmitter antagonists to spinal networks of the chick embryo. *J Neurosci* 18:294-306.

Chudotvorova I, Ivanov A, Rama S, Hubner CA, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Medina I (2005) Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses. *J Physiol* 566:671-679.

Cina C, Hochman S (2000) Diffuse distribution of sulforhodamine-labeled neurons during serotonin-evoked locomotion in the neonatal rat thoracolumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 423:590-602.

Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC (2009) Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *J Neurosci* 29:2009-2021.

Colonnese MT, Shi J, Constantine-Paton M (2003) Chronic NMDA receptor blockade from birth delays the maturation of NMDA currents, but does not affect AMPA/kainate currents. *J Neurophysiol* 89:57-68.

Corlew R, Bosma MM, Moody WJ (2004) Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *J Physiol* 560:377-390.

Cossart R, Petanjek Z, Dumitriu D, Hirsch JC, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C (2006) Interneurons targeting similar layers receive synaptic inputs with similar kinetics. *H* 16:408-420.

Crair MC, Malenka RC (1995) A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375:325-328.

Crepel V, Aronov D, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R (2007) A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* 54:105-120.

Cutsuridis V, Wennekers T, Graham BP, Vida I, Taylor JG (2009) Microcircuits--their structure, dynamics and role for brain function. *Neural Netw* 22:1037-1038.

Dallas M, Boycott HE, Atkinson L, Miller A, Boyle JP, Pearson HA, Peers C (2007) Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *J Neurosci* 27:3946-3955.

Dallman JE, Davis AK, Moody WJ (1998) Spontaneous activity regulates calcium-dependent K⁺ current expression in developing ascidian muscle. *J Physiol* 511 (Pt 3):683-693.

Danglot L, Triller A, Marty S (2006) The development of hippocampal interneurons in rodents. *H* 16:1032-1060.

Dargent B, Couraud F (1990) Down-regulation of voltage-dependent sodium channels initiated by sodium influx in developing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5907-5911.

Dargent B, Paillart C, Carlier E, Alcaraz G, Martin-Eauclaire MF, Couraud F (1994) Sodium channel internalization in developing neurons. *Neuron* 13:683-690.

David C, Schleicher A, Zuschratter W, Staiger JF (2007) The innervation of parvalbumin-containing interneurons by VIP-immunopositive interneurons in the primary somatosensory cortex of the adult rat. *Eur J Neurosci* 25:2329-2340.

Davies AM (2003) Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J* 22:2537-2545.

Daw MI, Ashby MC, Isaac JT (2007) Coordinated developmental recruitment of latent fast spiking interneurons in layer IV barrel cortex. *Nat Neurosci* 10:453-461.

de Lima AD, Gieseler A, Voigt T (2009) Relationship between GABAergic interneurons migration and early neocortical network activity. *Dev Neurobiol* 69:105-123.

de Lima AD, Opitz T, Voigt T (2004) Irreversible loss of a subpopulation of cortical interneurons in the absence of glutamatergic network activity. *Eur J Neurosci* 19:2931-2943.

De Simoni A, Griesinger CB, Edwards FA (2003) Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J Physiol* 550:135-147.

DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.

Delpire E (2000) Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* 15:309-312.

Demarque M, Represa A, Becq H, Khalilov I, Ben Ari Y, Aniksztejn L (2002) Paracrine intercellular communication by a Ca²⁺- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron* 36:1051-1061.

Demarque M, Villeneuve N, Manent JB, Becq H, Represa A, Ben-Ari Y, Aniksztejn L (2004) Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. *J Neurosci* 24:3289-3294.

Demir R, Gao BX, Jackson MB, Ziskind-Conhaim L (2002) Interactions between multiple rhythm generators produce complex patterns of oscillation in the developing rat spinal cord. *J Neurophysiol* 87:1094-1105.

Desai NS, Rutherford LC, Turrigiano GG (1999) Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2:515-520.

Desarmenien MG, Spitzer NC (1991) Role of calcium and protein kinase C in development of the delayed rectifier potassium current in *Xenopus* spinal neurons. *Neuron* 7:797-805.

Desfeux A, El GF, Jegou S, Legros H, Marret S, Laudenbach V, Gonzalez BJ (2010) Dual effect of glutamate on GABAergic interneuron survival during cerebral cortex development in mice neonates. *Cereb Cortex* 20:1092-1108.

Dillon C, Goda Y (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 28:25-55.

Doischer D, Hosp JA, Yanagawa Y, Obata K, Jonas P, Vida I, Bartos M (2008) Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices. *J Neurosci* 28:12956-12968.

Dupont E, Hangartner IL, Kilb W, Hirsch S, Luhmann HJ (2006) Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* 439:79-83.

- Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381:71-75.
- Elias LA, Kriegstein AR (2008) Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends Neurosci* 31:243-250.
- Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448:901-907.
- Ellender TJ, Nissen W, Colgin LL, Mann EO, Paulsen O (2010) Priming of hippocampal population bursts by individual perisomatic-targeting interneurons. *J Neurosci* 30:5979-5991.
- Feldman DE, Knudsen EI (1998) Experience-dependent plasticity and the maturation of glutamatergic synapses. *Neuron* 20:1067-1071.
- Feldmeyer D, Cull-Candy S (1996) Functional consequences of changes in NMDA receptor subunit expression during development. *J Neurocytol* 25:857-867.
- Feldt S, Wang JX, Hetrick VL, Berke JD, Zochowski M (2010) Memory formation: from network structure to neural dynamics. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 368:2251-2267.
- Feller MB, Wellis DP, Stellwagen D, Werblin FS, Shatz CJ (1996) Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science* 272:1182-1187.
- Fenili D, De BU (2003) Organotypic slices in vitro: repeated, same-cell, high-resolution tracking of nuclear and cytoplasmic fluorescent signals in live, transfected cerebellar neurons by confocal microscopy. *Brain Res Brain Res Protoc* 11:101-110.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18:8900-8911.
- Fields RD, Neale EA, Nelson PG (1990) Effects of patterned electrical activity on neurite outgrowth from mouse sensory neurons. *J Neurosci* 10:2950-2964.
- Fiorentino H, Kuczewski N, Diabira D, Ferrand N, Pangalos MN, Porcher C, Gaiarsa JL (2009) GABA(B) receptor activation triggers BDNF release and promotes the maturation of GABAergic synapses. *J Neurosci* 29:11650-11661.
- Fiszman ML, Borodinsky LN, Neale JH (1999) GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 115:1-8.
- Fleidervish IA, Binshtok AM, Gutnick MJ (1998) Functionally distinct NMDA receptors mediate horizontal connectivity within layer 4 of mouse barrel cortex. *Neuron* 21:1055-1065.
- Flint AC, Maisch US, Weishaupt JH, Kriegstein AR, Monyer H (1997) NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci* 17:2469-2476.
- Forsythe ID (2007) Hearing: a fantasia on Kolliker's organ. *Nature* 450:43-44.

Frank CA, Kennedy MJ, Goold CP, Marek KW, Davis GW (2006) Mechanisms underlying the rapid induction and sustained expression of synaptic homeostasis. *Neuron* 52:663-677.

Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *H* 6:347-470.

Frotscher M, Chai X, Bock HH, Haas CA, Forster E, Zhao S (2009) Role of Reelin in the development and maintenance of cortical lamination. *J Neural Transm* 116:1451-1455.

Fu LY, van den Pol AN (2007) GABA excitation in mouse hilar neuropeptide Y neurons. *J Physiol* 579:445-464.

Fushiki S, Perez Velazquez JL, Zhang L, Bechberger JF, Carlen PL, Naus CC (2003) Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:304-314.

Gabriele ML, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2000) Plasticity in the development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat after unilateral cochlear ablation. *J Neurosci* 20:6939-6949.

Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20:471-477.

Galli-Resta L, Resta G (1992) A quantitative model for the regulation of naturally occurring cell death in the developing vertebrate nervous system. *J Neurosci* 12:4586-4594.

Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105:521-532.

Gao WJ, Zheng ZH (2004) Target-specific differences in somatodendritic morphology of layer V pyramidal neurons in rat motor cortex. *J Comp Neurol* 476:174-185.

Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A (1998) Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol (Lond)* 507:219-236.

Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A (2000) Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* 3:452-459.

Gelman DM, Martini FJ, Nobrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marin O (2009) The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29:9380-9389.

Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263:1618-1623.

Giraud P, Alcaraz G, Jullien F, Sampo B, Jover E, Couraud F, Dargent B (1998) Multiple pathways regulate the expression of genes encoding sodium channel subunits in developing neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 56:238-255.

Giusi G, Facciolo RM, Rende M, Alo R, Di VA, Salerno S, Morelli S, De BL, Drioli E, Canonaco M (2009) Distinct alpha subunits of the GABA_A receptor are responsible for early hippocampal silent neuron-related activities. *H* 19:1103-1114.

Glykys J, Dzhala VI, Kuchibhotla KV, Feng G, Kuner T, Augustine G, Bacskai BJ, Staley KJ (2009) Differences in cortical versus subcortical GABAergic signaling: a candidate mechanism of electroclinical uncoupling of neonatal seizures. *Neuron* 63:657-672.

Godfrey KB, Swindale NV (2007) Retinal wave behavior through activity-dependent refractory periods. *PLoS Comput Biol* 3:e245.

Goldberg JL, Espinosa JS, Xu Y, Davidson N, Kovacs GT, Barres BA (2002) Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron* 33:689-702.

Golshani P, Goncalves JT, Khoshkhoo S, Mostany R, Smirnakis S, Portera-Cailliau C (2009) Internally mediated developmental desynchronization of neocortical network activity. *J Neurosci* 29:10890-10899.

Gomez TM, Snow DM, Letourneau PC (1995) Characterization of spontaneous calcium transients in nerve growth cones and their effect on growth cone migration. *Neuron* 14:1233-1246.

Gomez TM, Spitzer NC (1999) In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 397:350-355.

Gozlan H, Ben Ari Y (2003) Interneurons are the source and the targets of the first synapses formed in the rat developing hippocampal circuit. *Cereb Cortex* 13:684-692.

Grillner S (2006) Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52:751-766.

Groc L, Gustafsson B, Hanse E (2006) AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there! *Trends Neurosci* 29:132-139.

Grosse G, Draguhn A, Hohne L, Tapp R, Veh RW, hnert-Hilger G (2000) Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *J Neurosci* 20:1869-1882.

Gu X, Spitzer NC (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients. *Nature* 375:784-787.

Guido W (2008) Refinement of the retinogeniculate pathway. *J Physiol* 586:4357-4362.

Gummer AW, Mark RF (1994) Patterned neural activity in brain stem auditory areas of a prehearing mammal, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Neuroreport* 5:685-688.

Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3:342-355.

Hall BJ, Ghosh A (2008) Regulation of AMPA receptor recruitment at developing synapses. *Trends Neurosci* 31:82-89.

Hansen KA, Torborg CL, Elstrott J, Feller MB (2005) Expression and function of the neuronal gap junction protein connexin 36 in developing mammalian retina. *J Comp Neurol* 493:309-320.

Hanson MG, Landmesser LT (2003) Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* 23:587-600.

Hanson MG, Landmesser LT (2004) Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron* 43:687-701.

Hanson MG, Landmesser LT (2006) Increasing the frequency of spontaneous rhythmic activity disrupts pool-specific axon fasciculation and pathfinding of embryonic spinal motoneurons. *J Neurosci* 26:12769-12780.

Hanson MG, Milner LD, Landmesser LT (2008) Spontaneous rhythmic activity in early chick spinal cord influences distinct motor axon pathfinding decisions. *Brain Res Rev* 57:77-85.

Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26:81-89.

Hattox AM, Nelson SB (2007) Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties. *J Neurophysiol* 98:3330-3340.

Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20:5764-5774.

Heck N, Kilb W, Reiprich P, Kubota H, Furukawa T, Fukuda A, Luhmann HJ (2007) GABA-A receptors regulate neocortical neuronal migration in vitro and in vivo. *Cereb Cortex* 17:138-148.

Hefti BJ, Smith PH (2000) Anatomy, physiology, and synaptic responses of rat layer V auditory cortical cells and effects of intracellular GABA(A) blockade. *J Neurophysiol* 83:2626-2638.

Heins N, Cremisi F, Malatesta P, Gangemi RM, Corte G, Price J, Goudreau G, Gruss P, Gotz M (2001) Emx2 promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex. *Mol Cell Neurosci* 18:485-502.

Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Gotz M (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 5:308-315.

Hennou S, Khalilov I, Diabira D, Ben Ari Y, Gozlan H (2002) Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *Eur J Neurosci* 16:197-208.

Herkert M, Rottger S, Becker CM (1998) The NMDA receptor subunit NR2B of neonatal rat brain: complex formation and enrichment in axonal growth cones. *Eur J Neurosci* 10:1553-1562.

Hevner RF (2006) From radial glia to pyramidal-projection neuron: transcription factor cascades in cerebral cortex development. *Mol Neurobiol* 33:33-50.

Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, Gotoh Y (2004) The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131:2791-2801.

Holmes GL, Ben-Ari Y (2007) A single episode of neonatal seizures permanently alters glutamatergic synapses. *Ann Neurol* 61:379-381.

Holmgren CD, Mukhtarov M, Malkov AE, Popova IY, Bregestovski P, Zilberter Y (2010) Energy substrate availability as a determinant of neuronal resting potential, GABA signaling and spontaneous network activity in the neonatal cortex in vitro. *J Neurochem* 112:900-912.

Holopainen IE (2005) Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochem Res* 30:1521-1528.

Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME (2008) A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron* 60:610-624.

Houweling AR, Brecht M (2008) Behavioural report of single neuron stimulation in somatosensory cortex. *Nature* 451:65-68.

Huang ZJ (2009) Activity-dependent development of inhibitory synapses and innervation pattern: role of GABA signalling and beyond. *J Physiol* 587:1881-1888.

Huang ZJ, Scheiffele P (2008) GABA and neuroligin signaling: linking synaptic activity and adhesion in inhibitory synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 18:77-83.

Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106-154.

Huberman AD, Stellwagen D, Chapman B (2002) Decoupling eye-specific segregation from lamination in the lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* 22:9419-9429.

Huberman AD, Wang GY, Liets LC, Collins OA, Chapman B, Chalupa LM (2003) Eye-specific retinogeniculate segregation independent of normal neuronal activity. *Science* 300:994-998.

Hultborn H, Nielsen JB (2007) Spinal control of locomotion--from cat to man. *Acta Physiol (Oxf)* 189:111-121.

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283:70-74.

Isaac JT (2003) Postsynaptic silent synapses: evidence and mechanisms. *Neuropharmacology* 45:450-460.

Isaac JT, Crair MC, Nicoll RA, Malenka RC (1997) Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron* 18:269-280.

- Jiang M, Swann JW (2005) A role for L-type calcium channels in the maturation of parvalbumin-containing hippocampal interneurons. *Neuroscience* 135:839-850.
- Jiang MH, Oliva AA, Lam T, Swann JW (2001) GABAergic neurons that pioneer hippocampal area CA1 of the mouse: Morphologic features and multiple fates. *Journal of Comparative Neurology* 439:176-192.
- Jones TA, Jones SM, Paggett KC (2001) Primordial rhythmic bursting in embryonic cochlear ganglion cells. *J Neurosci* 21:8129-8135.
- Jones TA, Leake PA, Snyder RL, Stakhovskaya O, Bonham B (2007) Spontaneous discharge patterns in cochlear spiral ganglion cells before the onset of hearing in cats. *J Neurophysiol* 98:1898-1908.
- Jontes JD, Smith SJ (2000) Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* 27:11-14.
- Juszczak GR, Swiergiel AH (2009) Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:181-198.
- Kaiser M, Hilgetag CC, van OA (2009) A simple rule for axon outgrowth and synaptic competition generates realistic connection lengths and filling fractions. *Cereb Cortex* 19:3001-3010.
- Kandler K (2004) Activity-dependent organization of inhibitory circuits: lessons from the auditory system. *Curr Opin Neurobiol* 14:96-104.
- Kandler K, Clause A, Noh J (2009) Tonotopic reorganization of developing auditory brainstem circuits. *Nat Neurosci* 12:711-717.
- Kandler K, Katz LC (1998) Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci* 18:1419-1427.
- Kasper EM, Larkman AU, Lubke J, Blakemore C (1994) Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. II. Development of electrophysiological properties. *J Comp Neurol* 339:475-494.
- Katz LC (1991) Specificity in the Development of Vertical Connections in Cat Striate Cortex. *Eur J Neurosci* 3:1-9.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.
- Khazipov R, Luhmann HJ (2006) Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci* 29:414-418.
- Khazipov R, Sirota A, Leinekugel X, Holmes GL, Ben Ari Y, Buzsaki G (2004) Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 432:758-761.

Kim S, Nah SY, Rhim H (2008) Neuroprotective effects of ginseng saponins against L-type Ca²⁺ channel-mediated cell death in rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 365:399-405.

Kittila CA, Massey SC (1997) Pharmacology of directionally selective ganglion cells in the rabbit retina. *J Neurophysiol* 77:675-689.

Klausberger T, Somogyi P (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321:53-57.

Komuro H, Rakic P (1996) Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron* 17:275-285.

Konur S, Ghosh A (2005) Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46:401-405.

Kornack DR, Rakic P (1995) Radial and horizontal deployment of clonally related cells in the primate neocortex: relationship to distinct mitotic lineages. *Neuron* 15:311-321.

Kubota S, Kitajima T (2008) A model for synaptic development regulated by NMDA receptor subunit expression. *J Comput Neurosci* 24:1-20.

Kumar SS, Huguenard JR (2003) Pathway-specific differences in subunit composition of synaptic NMDA receptors on pyramidal neurons in neocortex. *J Neurosci* 23:10074-10083.

Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA (2006) Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311:847-851.

Lara A, Dargent B, Julien F, Alcaraz G, Tricaud N, Couraud F, Jover E (1996) Channel activators reduce the expression of sodium channel alpha-subunit mRNA in developing neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 37:116-124.

Leake PA, Hradek GT, Chair L, Snyder RL (2006) Neonatal deafness results in degraded topographic specificity of auditory nerve projections to the cochlear nucleus in cats. *J Comp Neurol* 497:13-31.

Lee S, Christakos S, Small MB (1993) Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 5:286-291.

Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben Ari Y, Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243-255.

Leveille F, Papadia S, Fricker M, Bell KF, Soriano FX, Martel MA, Puddifoot C, Habel M, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Tolokovsky AM, Hardingham GE (2010) Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci* 30:2623-2635.

Li CY, Poo MM, Dan Y (2009) Burst spiking of a single cortical neuron modifies global brain state. *Science* 324:643-646.

Lin CW, Sim S, Ainsworth A, Okada M, Kelsch W, Lois C (2010) Genetically increased cell-intrinsic excitability enhances neuronal integration into adult brain circuits. *Neuron* 65:32-39.

Lin W, Zhu Q, Gao W, Chen Y, Toh CH, Styner M, Gerig G, Smith JK, Biswal B, Gilmore JH (2008a) Functional connectivity MR imaging reveals cortical functional connectivity in the developing brain. *AJNR Am J Neuroradiol* 29:1883-1889.

Lin Y, Bloodgood BL, Hauser JL, Lapan AD, Koon AC, Kim TK, Hu LS, Malik AN, Greenberg ME (2008b) Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. *Nature* 455:1198-1204.

Linden R (1994) The survival of developing neurons: a review of afferent control. *Neuroscience* 58:671-682.

Lindlbauer R, Mohrmann R, Hatt H, Gottmann K (1998) Regulation of kinetic and pharmacological properties of synaptic NMDA receptors depends on presynaptic exocytosis in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 508 (Pt 2):495-502.

Lippe WR (1994) Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J Neurosci* 14:1486-1495.

Lischalk JW, Easton CR, Moody WJ (2009) Bilaterally propagating waves of spontaneous activity arising from discrete pacemakers in the neonatal mouse cerebral cortex. *Dev Neurobiol* 69:407-414.

Liu SJ, Kaczmarek LK (1998a) The expression of two splice variants of the Kv3.1 potassium channel gene is regulated by different signaling pathways. *J Neurosci* 18:2881-2890.

Liu SQ, Kaczmarek LK (1998b) Depolarization selectively increases the expression of the Kv3.1 potassium channel in developing inferior colliculus neurons. *J Neurosci* 18:8758-8769.

Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179-1187.

Lohmann C, Myhr KL, Wong RO (2002) Transmitter-evoked local calcium release stabilizes developing dendrites. *Nature* 418:177-181.

Lohmann C, Wong RO (2005) Regulation of dendritic growth and plasticity by local and global calcium dynamics. *Cell Calcium* 37:403-409.

London M, Roth A, Beeren L, Hausser M, Latham PE (2010) Sensitivity to perturbations in vivo implies high noise and suggests rate coding in cortex. *Nature* 466:123-127.

Lossi L, Alasia S, Salio C, Merighi A (2009) Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 88:221-245.

LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15:1287-1298.

Ludwig A, Li H, Saarma M, Kaila K, Rivera C (2003) Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur J Neurosci* 18:3199-3206.

Luo J, Chen H, Kintner DB, Shull GE, Sun D (2005) Decreased neuronal death in Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1-null mice after in vitro and in vivo ischemia. *J Neurosci* 25:11256-11268.

Major G, Larkman AU, Jonas P, Sakmann B, Jack JJ (1994) Detailed passive cable models of whole-cell recorded CA3 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 14:4613-4638.

Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253-5263.

Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A (2005) A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* 25:4755-4765.

Marder E, Goaillard JM (2006) Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nat Rev Neurosci* 7:563-574.

Marek KW, Kurtz LM, Spitzer NC (2010) cJun integrates calcium activity and tlx3 expression to regulate neurotransmitter specification. *Nat Neurosci* 13:944-950.

Maric D, Liu QY, Maric I, Chaudry S, Chang YH, Smith SV, Sieghart W, Fritschy JM, Barker JL (2001) GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA(A) autoreceptor/Cl⁻ channels. *J Neurosci* 21:2343-2360.

Marin O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780-790.

Marini AM, Jiang X, Wu X, Tian F, Zhu D, Okagaki P, Lipsky RH (2004) Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor Neurol Neurosci* 22:121-130.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.

Markwardt SJ, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche LS (2009) Input-specific GABAergic signaling to newborn neurons in adult dentate gyrus. *J Neurosci* 29:15063-15072.

Marty S, Berninger B, Carroll P, Thoenen H (1996) GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron* 16:565-570.

Marty S, Wehrle R, varez-Leefmans FJ, Gasnier B, Sotelo C (2002) Postnatal maturation of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci* 15:233-245.

Mason A, Larkman A (1990) Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. *J Neurosci* 10:1415-1428.

- Masuda N, Aihara K (2003) Duality of rate coding and temporal coding in multilayered feedforward networks. *Neural Comput* 15:103-125.
- McCabe AK, Chisholm SL, Picken-Bahrey HP, Moody WJ (2006) The self-regulating nature of spontaneous synchronized activity in developing mouse cortical neurones. *J Physiol* 577:155-167.
- McCormick DA, Prince DA (1987) Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones. *J Physiol* 393:743-762.
- McDonald JW, Johnston MV (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 15:41-70.
- McKinney RA, Capogna M, Durr R, Gahwiler BH, Thompson SM (1999) Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci* 2:44-49.
- McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, O'Leary DD (2003) Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron* 40:1147-1160.
- Meunier D, Lambiotte R, Fornito A, Ersche KD, Bullmore ET (2009) Hierarchical modularity in human brain functional networks. *Front Neuroinformatics* 3:37.
- Miles R, Wong R (1983) Single neurons can initiate synchronized population discharge in the hippocampus. *Nature* 306:371-373.
- Milh M, Becq H, Villeneuve N, Ben-Ari Y, Aniksztejn L (2007a) Inhibition of glutamate transporters results in a "suppression-burst" pattern and partial seizures in the newborn rat. *Epilepsia* 48:169-174.
- Milh M, Kaminska A, Huon C, Lapillonne A, Ben-Ari Y, Khazipov R (2007b) Rapid cortical oscillations and early motor activity in premature human neonate. *Cereb Cortex* 17:1582-1594.
- Minlebaev M, Ben-Ari Y, Khazipov R (2007) Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex *in vivo*. *J Neurophysiol* 97:692-700.
- Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31:727-741.
- Miyata T, Kawaguchi D, Kawaguchi A, Gotoh Y (2010) Mechanisms that regulate the number of neurons during mouse neocortical development. *Curr Opin Neurobiol* 20:22-28.
- Miyoshi G, Butt SJ, Takebayashi H, Fishell G (2007) Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci* 27:7786-7798.
- Miyoshi G, Fishell G (2006) Directing neuron-specific transgene expression in the mouse CNS. *Curr Opin Neurobiol* 16:577-584.
- Miyoshi G, Fishell G (2010) GABAergic Interneuron Lineages Selectively Sort into Specific Cortical Layers during Early Postnatal Development. *Cereb Cortex*.

Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G (2010) Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* 30:1582-1594.

Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y (2010) Pre-synaptic and post-synaptic neuronal activity supports the axon development of callosal projection neurons during different post-natal periods in the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 31:410-424.

Mohrmann R, Lessmann V, Gottmann K (2003) Developmental maturation of synaptic vesicle cycling as a distinctive feature of central glutamatergic synapses. *Neuroscience* 117:7-18.

Molnar G, Olah S, Komlosi G, Fule M, Szabadics J, Varga C, Barzo P, Tamas G (2008) Complex events initiated by individual spikes in the human cerebral cortex. *PLoS Biol* 6:e222.

Momose-Sato Y, Sato K, Kinoshita M (2007) Spontaneous depolarization waves of multiple origins in the embryonic rat CNS. *Eur J Neurosci* 25:929-944.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seuberg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.

Moody WJ, Bosma MM (2005) Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* 85:883-941.

Morishima M, Kawaguchi Y (2006) Recurrent connection patterns of corticostriatal pyramidal cells in frontal cortex. *J Neurosci* 26:4394-4405.

Mostafapour SP, Cochran SL, Del Puerto NM, Rubel EW (2000) Patterns of cell death in mouse anteroventral cochlear nucleus neurons after unilateral cochlea removal. *J Comp Neurol* 426:561-571.

Mostafapour SP, Del Puerto NM, Rubel EW (2002) bcl-2 Overexpression eliminates deprivation-induced cell death of brainstem auditory neurons. *J Neurosci* 22:4670-4674.

Mountcastle VB (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20:408-434.

Mountcastle VB (1978) Brain mechanisms for directed attention. *J R Soc Med* 71:14-28.

Mountcastle VB (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4):701-722.

Muir-Robinson G, Hwang BJ, Feller MB (2002) Retinogeniculate axons undergo eye-specific segregation in the absence of eye-specific layers. *J Neurosci* 22:5259-5264.

Myers CP, Lewcock JW, Hanson MG, Gosgnach S, Aimone JB, Gage FH, Lee KF, Landmesser LT, Pfaff SL (2005) Cholinergic input is required during embryonic development to mediate proper assembly of spinal locomotor circuits. *Neuron* 46:37-49.

Nadarajah B, Jones AM, Evans WH, Parnavelas JG (1997) Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *J Neurosci* 17:3096-3111.

Nadarajah B, Parnavelas JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423-432.

Nakayama K, Nishimaru H, Iizuka M, Ozaki S, Kudo N (1999) Rostrocaudal progression in the development of periodic spontaneous activity in fetal rat spinal motor circuits in vitro. *J Neurophysiol* 81:2592-2595.

Nakayama K, Nishimaru H, Kudo N (2002) Basis of changes in left-right coordination of rhythmic motor activity during development in the rat spinal cord. *J Neurosci* 22:10388-10398.

Neal AP, Molina-Campos E, Marrero-Rosado B, Bradford AB, Fox SM, Kovalova N, Hannon HE (2010) CaMKK-CaMKI signaling pathways differentially control axon and dendrite elongation in cortical neurons. *J Neurosci* 30:2807-2809.

Nicol X, Voyatzis S, Muzerelle A, Narboux-Neme N, Sudhof TC, Miles R, Gaspar P (2007) cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. *Nat Neurosci* 10:340-347.

Niell CM, Meyer MP, Smith SJ (2004) In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nat Neurosci* 7:254-260.

Nishimaru H, Iizuka M, Ozaki S, Kudo N (1996) Spontaneous motoneuronal activity mediated by glycine and GABA in the spinal cord of rat fetuses in vitro. *J Physiol* 497 (Pt 1):131-143.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.

Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7:136-144.

O'Donovan MJ (1999) The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9:94-104.

O'Leary DD, Crespo D, Fawcett JW, Cowan WM (1986) The effect of intraocular tetrodotoxin on the postnatal reduction in the numbers of optic nerve axons in the rat. *Brain Res* 395:96-103.

Ohtahara S, Yamatogi Y (2003) Epileptic encephalopathies in early infancy with suppression-burst. *J Clin Neurophysiol* 20:398-407.

Okabe S, Collin C, Auerbach JM, Meiri N, Bengzon J, Kennedy MB, Segal M, McKay RD (1998) Hippocampal synaptic plasticity in mice overexpressing an embryonic subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18:4177-4188.

- Okaty BW, Miller MN, Sugino K, Hempel CM, Nelson SB (2009) Transcriptional and electrophysiological maturation of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29:7040-7052.
- Olah S, Fule M, Komlosi G, Varga C, Baldi R, Barzo P, Tamas G (2009) Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature* 461:1278-1281.
- Ono T, Sekino-Suzuki N, Kikkawa Y, Yonekawa H, Kawashima S (2003) Alivin 1, a novel neuronal activity-dependent gene, inhibits apoptosis and promotes survival of cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 23:5887-5896.
- Opitz T, de Lima AD, Voigt T (2002) Spontaneous development of synchronous oscillatory activity during maturation of cortical networks in vitro. *J Neurophysiol* 88:2196-2206.
- Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J (1991) Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 251:1616-1618.
- Otsuka T, Kawaguchi Y (2008) Firing-pattern-dependent specificity of cortical excitatory feed-forward subnetworks. *J Neurosci* 28:11186-11195.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16:6414-6423.
- Owens DF, Kriegstein AR (1998) Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J Neurosci* 18:5374-5388.
- Paillart C, Boudier JL, Boudier JA, Rochat H, Couraud F, Dargent B (1996) Activity-induced internalization and rapid degradation of sodium channels in cultured fetal neurons. *J Cell Biol* 134:499-509.
- Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2005) Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* 25:4279-4287.
- Parnavelas JG (2000) The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* 23:126-131.
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26:199-206.
- Peinado A (2000) Traveling slow waves of neural activity: a novel form of network activity in developing neocortex. *J Neurosci* 20:RC54.
- Peinado A (2001) Immature neocortical neurons exist as extensive syncytial networks linked by dendrodendritic electrical connections. *J Neurophysiol* 85:620-629.
- Penn AA, Riquelme PA, Feller MB, Shatz CJ (1998) Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. *Science* 279:2108-2112.

Peters A, Jones E (1984) Classification of cortical neurons. In: Cerebral cortex, Vol. 1, Cellular components of the cerebral cortex (Jones E, Peters A, eds), pp 107-121. New York: Plenum Press.

Peters A, Sethares C (1991) Organization of pyramidal neurons in area 17 of monkey visual cortex. *J Comp Neurol* 306:1-23.

Petralia RS, Wang YX, Hua F, Yi Z, Zhou A, Ge L, Stephenson FA, Wenthold RJ (2010) Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167:68-87.

Pfeffer CK, Stein V, Keating DJ, Maier H, Rinke I, Rudhard Y, Hentschke M, Rune GM, Jentsch TJ, Hubner CA (2009) NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development. *J Neurosci* 29:3419-3430.

Plenz D, Thiagarajan TC (2007) The organizing principles of neuronal avalanches: cell assemblies in the cortex? *Trends Neurosci* 30:101-110.

Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R (2003) Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: Evidence for different types of dendritic filopodia. *Journal of Neuroscience* 23:7129-7142.

Portera-Cailliau C, Yuste R (2001) On the function of dendritic filopodia. *Revista de Neurologia* 33:1158-1166.

Posada A, Clarke PG (1999) The role of neuronal death during the development of topographically ordered projections: a computational approach. *Biol Cybern* 81:239-247.

Purves D, LaMantia AS (1990) Numbers of "blobs" in the primary visual cortex of neonatal and adult monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5764-5767.

Radnikow G, Feldmeyer D, Lubke J (2002) Axonal projection, input and output synapses, and synaptic physiology of Cajal-Retzius cells in the developing rat neocortex. *J Neurosci* 22:6908-6919.

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262:695-700.

Rajan I, Cline HT (1998) Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites *in vivo*. *J Neurosci* 18:7836-7846.

Raman IM, Sprunger LK, Meisler MH, Bean BP (1997) Altered subthreshold sodium currents and disrupted firing patterns in Purkinje neurons of Scn8a mutant mice. *Neuron* 19:881-891.

Redmond L, Ghosh A (2005) Regulation of dendritic development by calcium signaling. *Cell Calcium* 37:411-416.

Redmond L, Kashani AH, Ghosh A (2002) Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34:999-1010.

Ren J, Greer JJ (2003) Ontogeny of rhythmic motor patterns generated in the embryonic rat spinal cord. *J Neurophysiol* 89:1187-1195.

Rheims S, Holmgren CD, Chazal G, Mulder J, Harkany T, Zilberter T, Zilberter Y (2009) GABA action in immature neocortical neurons directly depends on the availability of ketone bodies. *J Neurochem* 110:1330-1338.

Rheims S, Minlebaev M, Ivanov A, Represa A, Khazipov R, Holmes GL, Ben-Ari Y, Zilberter Y (2008a) Excitatory GABA in rodent developing neocortex in vitro. *J Neurophysiol* 100:609-619.

Rheims S, Represa A, Ben-Ari Y, Zilberter Y (2008b) Layer-specific generation and propagation of seizures in slices of developing neocortex: role of excitatory GABAergic synapses. *J Neurophysiol* 100:620-628.

Rice D, Barone S Jr (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3:511-533.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.

Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, Payne JA, Minichiello L, Saarma M, Kaila K (2004) Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 24:4683-4691.

Roberts AC, ez-Garcia J, Rodriguez RM, Lopez IP, Lujan R, Martinez-Turrillas R, Pico E, Henson MA, Bernardo DR, Jarrett TM, Clendeninn DJ, Lopez-Mascaraque L, Feng G, Lo DC, Wesseling JF, Wetsel WC, Philpot BD, Perez-Otano I (2009) Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. *Neuron* 63:342-356.

Rockland KS, Ichinohe N (2004) Some thoughts on cortical minicolumns. *Exp Brain Res* 158:265-277.

Roerig B, Feller MB (2000) Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 32:86-114.

Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39:13-25.

Rossi FM, Pizzorusso T, Porciatti V, Marubio LM, Maffei L, Changeux JP (2001) Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6453-6458.

Roy K, Kuznicki K, Wu Q, Sun Z, Bock D, Schutz G, Vranich N, Monaghan AP (2004) The Tlx gene regulates the timing of neurogenesis in the cortex. *J Neurosci* 24:8333-8345.

Rubel EW, Fritzsch B (2002) Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu Rev Neurosci* 25:51-101.

Rumpel S, Hatt H, Gottmann K (1998) Silent synapses in the developing rat visual cortex: evidence for postsynaptic expression of synaptic plasticity. *J Neurosci* 18:8863-8874.

Sauer JF, Bartos M (2010) Recruitment of early postnatal parvalbumin-positive hippocampal interneurons by GABAergic excitation. *J Neurosci* 30:110-115.

Scain AL, Le Corronc H, Allain AE, Muller E, Rigo JM, Meyrand P, Branchereau P, Legendre P (2010) Glycine release from radial cells modulates the spontaneous activity and its propagation during early spinal cord development. *J Neurosci* 30:390-403.

Scantlebury MH, Heida JG, Hasson HJ, Veliskova J, Velisek L, Galanopoulou AS, Moshe SL (2007) Age-dependent consequences of status epilepticus: Animal models. *Epilepsia* 48:75-82.

Scardigli R, Baumer N, Gruss P, Guillemot F, Le R, I (2003) Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6. *Development* 130:3269-3281.

Schubert D (2007) Observing without disturbing: how different cortical neuron classes represent tactile stimuli. *J Physiol* 581:5.

Segerstrale M, Juuri J, Lanore F, Piepponen P, Lauri SE, Mulle C, Taira T (2010) High firing rate of neonatal hippocampal interneurons is caused by attenuation of afterhyperpolarizing potassium currents by tonically active kainate receptors. *J Neurosci* 30:6507-6514.

Sendtner M, Pei G, Beck M, Schweizer U, Wiese S (2000) Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res* 301:71-84.

Sernagor E, Chabrol F, Bony G, Cancella L (2010) GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Front Cell Neurosci* 4:11.

Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.

Shi J, Aamodt SM, Townsend M, Constantine-Paton M (2001) Developmental depression of glutamate neurotransmission by chronic low-level activation of NMDA receptors. *J Neurosci* 21:6233-6244.

Shipp S, Zeki S (2002) The functional organization of area V2, I: specialization across stripes and layers. *Vis Neurosci* 19:187-210.

Sibilla S, Fabbro A, Grandolfo M, D'Andrea P, Nistri A, Ballerini L (2009) The patterns of spontaneous Ca²⁺ signals generated by ventral spinal neurons in vitro show time-dependent refinement. *Eur J Neurosci* 29:1543-1559.

Silberberg G, Grillner S, LeBeau FE, Maex R, Markram H (2005) Synaptic pathways in neural microcircuits. *Trends Neurosci* 28:541-551.

Sipila ST, Huttu K, Soltesz I, Voipio J, Kaila K (2005) Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. *J Neurosci* 25:5280-5289.

Sipila ST, Huttu K, Voipio J, Kaila K (2006) Intrinsic bursting of immature CA3 pyramidal neurons and consequent giant depolarizing potentials are driven by a persistent Na⁺ current and terminated by a slow Ca²⁺-activated K⁺ current. *Eur J Neurosci* 23:2330-2338.

Sipila ST, Kaila K (2008) GABAergic control of CA3-driven network events in the developing hippocampus. *Results Probl Cell Differ* 44:99-121.

Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459:698-702.

Sonntag M, Englitz B, Kopp-Scheinflug C, Rubsam R (2009) Early postnatal development of spontaneous and acoustically evoked discharge activity of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body: an in vivo study in mice. *J Neurosci* 29:9510-9520.

Soriano E, Cobas A, Fairen A (1986) Asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus. *Brain Res* 395:88-92.

Soriano E, Cobas A, Fairen A (1989a) Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. I: Regio superior and regio inferior. *J Comp Neurol* 281:586-602.

Soriano E, Cobas A, Fairen A (1989b) Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. II: Area dentata. *J Comp Neurol* 281:603-611.

Sotelo C, Dusart I (2009) Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience* 162:589-600.

Spigelman I, Zhang L, Carlen PL (1992) Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: Membrane excitability and K⁺ currents. *J Neurophysiol* 68:55-69.

Spoerri PE (1988) Neurotrophic effects of GABA in cultures of embryonic chick brain and retina. *Synapse* 2:11-22.

Sporns O, Tononi G, Edelman GM (2000) Theoretical neuroanatomy: relating anatomical and functional connectivity in graphs and cortical connection matrices. *Cereb Cortex* 10:127-141.

Sporns O, Zwi JD (2004) The small world of the cerebral cortex. *Neuroinformatics* 2:145-162.

Sretavan DW, Shatz CJ, Stryker MP (1988) Modification of retinal ganglion cell axon morphology by prenatal infusion of tetrodotoxin. *Nature* 336:468-471.

Stacy RC, Demas J, Burgess RW, Sanes JR, Wong RO (2005) Disruption and recovery of patterned retinal activity in the absence of acetylcholine. *J Neurosci* 25:9347-9357.

Stewart CV, Plenz D (2008) Homeostasis of neuronal avalanches during postnatal cortex development in vitro. *J Neurosci Methods* 169:405-416.

Stopponi L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.

Sun JJ, Luhmann HJ (2007) Spatio-temporal dynamics of oscillatory network activity in the neonatal mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 26:1995-2004.

Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104:365-376.

Syed MM, Lee S, Zheng J, Zhou ZJ (2004) Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina. *J Physiol* 560:533-549.

Takayama C, Inoue Y (2010) Developmental localization of potassium chloride co-transporter 2 (KCC2), GABA and vesicular GABA transporter (VGAT) in the postnatal mouse somatosensory cortex. *Neurosci Res* 67:137-148.

Tamamaki N, Nakamura K, Okamoto K, Kaneko T (2001) Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci Res* 41:51-60.

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60-79.

Tang F, Dent EW, Kalil K (2003) Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J Neurosci* 23:927-936.

Thurbon D, Luscher HR, Hofstetter T, Redman SJ (1998) Passive electrical properties of ventral horn neurons in rat spinal cord slices. *J Neurophysiol* 79:2485-2502.

Torborg CL, Feller MB (2005) Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. *Prog Neurobiol* 76:213-235.

Tovar KR, Westbrook GL (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19:4180-4188.

Tritsch NX, Bergles DE (2010) Developmental regulation of spontaneous activity in the Mammalian cochlea. *J Neurosci* 30:1539-1550.

Tritsch NX, Rodriguez-Contreras A, Crins TT, Wang HC, Borst JG, Bergles DE (2010) Calcium action potentials in hair cells pattern auditory neuron activity before hearing onset. *Nat Neurosci* 13:1050-1052.

Tritsch NX, Yi E, Gale JE, Glowatzki E, Bergles DE (2007) The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature* 450:50-55.

Tsiola A, Hamzei-Sichani F, Peterlin Z, Yuste R (2003) Quantitative morphologic classification of layer 5 neurons from mouse primary visual cortex. *Journal of Comparative Neurology* 461:415-428.

Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hubner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R (2006) Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* 314:1788-1792.

Tyzio R, Minlebaev M, Rheims S, Ivanov A, Jorquera I, Holmes GL, Zilberter Y, Ben-Ari Y, Khazipov R (2008) Postnatal changes in somatic gamma-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 27:2515-2528.

Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben Ari Y, Gozlan H, Aniksztejn L (1999) The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci* 19:10372-10382.

Ueda K, Shinohara S, Yagami T, Asakura K, Kawasaki K (1997) Amyloid beta protein potentiates Ca²⁺ influx through L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem* 68:265-271.

Valeeva G, Abdullin A, Tyzio R, Skorinkin A, Nikolski E, Ben-Ari Y, Khazipov R (2010) Temporal coding at the immature depolarizing GABAergic synapse. *Front Cell Neurosci* 4.

Vaughn JE (1989) Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse* 3:255-285.

Voigt T, Baier H, Dolabela de LA (1997) Synchronization of neuronal activity promotes survival of individual rat neocortical neurons in early development. *Eur J Neurosci* 9:990-999.

Voigt T, Opitz T, de Lima AD (2001) Synchronous oscillatory activity in immature cortical network is driven by GABAergic preplate neurons. *J Neurosci* 21:8895-8905.

Voigt T, Opitz T, de Lima AD (2005) Activation of early silent synapses by spontaneous synchronous network activity limits the range of neocortical connections. *J Neurosci* 25:4605-4615.

Walz C, Elssner-Beyer B, Schubert D, Gottmann K (2010) Properties of glutamatergic synapses in immature layer Vb pyramidal neurons: coupling of pre- and postsynaptic maturational states. *Exp Brain Res* 200:169-182.

Wang DD, Kriegstein AR (2008) GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* 28:5547-5558.

Wang DD, Kriegstein AR (2010) Blocking Early GABA Depolarization with Bumetanide Results in Permanent Alterations in Cortical Circuits and Sensorimotor Gating Deficits. *Cereb Cortex*.

Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23:20-26.

Wang XF, Chen GR (2002) Synchronization in small-world dynamical networks. *International Journal of Bifurcation and Chaos* 12:187-192.

Wasling P, Hanse E, Gustafsson B (2004) Developmental changes in release properties of the CA3-CA1 glutamate synapse in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 92:2714-2724.

Watt AJ, Cuntz H, Mori M, Nusser Z, Sjostrom PJ, Häusser M (2009) Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity. *Nat Neurosci* 12:463-473.

Wayman GA, Impey S, Marks D, Saneyoshi T, Grant WF, Derkach V, Soderling TR (2006) Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* 50:897-909.

Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR (2004) Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* 43:647-661.

Werner G (2007) Metastability, criticality and phase transitions in brain and its models. *Biosystems* 90:496-508.

West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11024-11031.

Wittner L, Miles R (2007) Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus. *J Physiol* 584:867-883.

Wonders CP, Anderson SA (2006) The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7:687-696.

Wong HK, Liu XB, Matos MF, Chan SF, Perez-Otano I, Boysen M, Cui JK, Nakanishi N, Trimmer JS, Jones EG, Lipton SA, Sucher NJ (2002) Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *Journal of Comparative Neurology* 450:303-317.

Wong RO, Ghosh A (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* 3:803-812.

Wong WT, Faulkner-Jones BE, Sanes JR, Wong RO (2000) Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *J Neurosci* 20:5024-5036.

Wong WT, Wong RO (2001) Changing specificity of neurotransmitter regulation of rapid dendritic remodeling during synaptogenesis. *Nat Neurosci* 4:351-352.

Woodruff AR, Sah P (2007) Inhibition and synchronization of basal amygdala principal neuron spiking by parvalbumin-positive interneurons. *J Neurophysiol* 98:2956-2961.

Xu Q, Cobos I, De La CE, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24:2612-2622.

Yang JW, Hanganu-Opatz IL, Sun JJ, Luhmann HJ (2009) Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks in vivo. *J Neurosci* 29:9011-9025.

Yu YC, Bultje RS, Wang XQ, Shi SH (2009) Specific synapses develop preferentially among sister excitatory neurons in the neocortex. *Nature* 458:501-5U3.

Yuste R, Nelson DA, Rubin WW, Katz LC (1995) Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. *Neuron* 14:7-17.

Yuste R, Peinado A, Katz LC (1992) Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 257:665-669.

Zhang ZW (2004) Maturation of layer V pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: intrinsic properties and synaptic function. *J Neurophysiol* 91:1171-1182.

Zheng J, Lee S, Zhou ZJ (2006) A transient network of intrinsically bursting starburst cells underlies the generation of retinal waves. *Nat Neurosci*.

Zheng JJ, Lee S, Zhou ZJ (2004) A developmental switch in the excitability and function of the starburst network in the mammalian retina. *Neuron* 44:851-864.

Zheng JQ, Poo MM (2007) Calcium signaling in neuronal motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:375-404.

Zhou ZJ (2001) The function of the cholinergic system in the developing mammalian retina. *Prog Brain Res* 131:599-613.

Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y, Malinow R (2000) Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3:1098-1106.

Zhu JJ, Malinow R (2002) Acute versus chronic NMDA receptor blockade and synaptic AMPA receptor delivery. *Nat Neurosci* 5:513-514.

Ziv NE, Garner CC (2001) Principles of glutamatergic synapse formation: seeing the forest for the trees. *Curr Opin Neurobiol* 11:536-543.

Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.